



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

**Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor
fisiológico de la H^+ -ATP sintasa de la mitocondria**

Javier García Bermúdez

Madrid, 2015

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

**Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor
fisiológico de la H^+ -ATP sintasa de la mitocondria**

Memoria presentada por el licenciado en Bioquímica

Javier García Bermúdez

Para obtener el grado de

Doctor en Biología Molecular

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: José Manuel Cuezva Marcos

Co-Director de Tesis: María Sánchez Aragón

Madrid, 2015

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) del Dr. José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid en el periodo de septiembre 2011 a 2015. Durante este periodo el licenciado Javier García Bermúdez ha disfrutado de una Beca/contrato predoctoral del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI-MICINN) asociada al proyecto BFU2010-18903.

A mi padre

SUMMARY

The mitochondrial H^+ -ATP synthase synthesizes most of cellular ATP requirements by oxidative phosphorylation (OXPHOS). The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) is a nuclear-encoded mitochondrial protein known to inhibit the ATP hydrolytic activity of the H^+ -ATP synthase to preserve the proton electrochemical gradient in situations that compromise respiration. Recent findings in colon cancer cells indicate that inhibition of the H^+ -ATP synthase by IF1 also affects ATP synthetic activity thus promoting aerobic glycolysis and a reactive oxygen species (ROS)-mediated signal that enhances proliferation and cell survival. Herein we have studied the mechanisms that govern the regulation of the expression and activity of IF1 and show the tight regulation exerted by IF1 on the H^+ -ATP synthase. We illustrate that the overexpression of isoform 1 of IF1 observed in human colon, lung, breast and ovarian carcinomas is exerted post-transcriptionally. We demonstrate that IF1 is a short-lived protein ($t_{1/2} = 4$ h) whose degradation depends on the activity of mitochondrial serine-proteases and on the inner mitochondrial membrane metalloprotease YME1L. In addition, we describe mechanisms that regulate translation of IF1 mRNA mediated by mitochondrial ROS and microRNA 24-3p. Moreover, this study also unveils a novel regulatory mechanism of IF1 activity: the phosphorylation of serine 39 of human IF1 by mitochondrial protein kinase A (PKA). Phosphorylation of IF1 abolishes its capacity to bind the H^+ -ATP synthase and hence to exert its biological activity on the enzyme. Only dephosphorylated IF1 binds and inhibits both the hydrolase and synthase activities of the enzyme. The phosphorylation status of IF1 regulates the flux of aerobic glycolysis and ATP production through OXPHOS in several cellular situations such as hypoxia or during cell cycle progression. Moreover, dephosphorylated IF1 is present in human carcinomas suggesting the importance of active IF1 for the tumorigenic phenotype. Remarkably, mouse heart contains a large fraction of dephosphorylated IF1 that becomes phosphorylated and inactivated upon *in vivo* β -adrenergic stimulation. Dephosphorylated IF1 is also less prone to its turnover than phosphorylated IF1. Overall, our results demonstrate the wide range of mechanisms that post-transcriptionally regulate IF1 expression and activity and stress the essential function of IF1 in regulating ATP output and energy metabolism.

RESUMEN

La H^+ -ATP sintasa es el complejo enzimático que se encarga de sintetizar la mayor parte de los requerimientos celulares de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El factor inhibidor de la ATPasa (IF1) es una proteína mitocondrial codificada en el núcleo cuya función descrita es la de inhibir la actividad ATP hidrolítica de la H^+ -ATP sintasa con el fin de preservar el ATP celular en situaciones que comprometen el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico y la OXPHOS. Estudios recientes en diferentes tipos celulares implican que la inhibición de la H^+ -ATP sintasa por IF1 afecta además a la actividad ATP sintética produciendo un aumento de la glucólisis aeróbica y una señal mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) que aumenta la proliferación y supervivencia celular. En este trabajo estudiamos los mecanismos que controlan la expresión y actividad de IF1 demostrando la relevancia de la acción inhibidora mediada por IF1 sobre la H^+ -ATP sintasa. La sobreexpresión de la proteína observada en carcinomas humanos de colon, pulmón, mama y ovario se debe a cambios en la regulación post-transcripcional de la expresión de la isoforma 1 de IF1. Demostramos que IF1 es una proteína de vida media corta ($t_{1/2} = 4$ h) cuya degradación depende de serín-proteasas mitocondriales y de la metaloproteasa de membrana interna mitocondrial YME1L. También describimos mecanismos de regulación traduccional del mRNA de IF1 mediada por ROS mitocondriales y el microRNA 24-3p. En este trabajo se desvela un nuevo mecanismo regulador de la actividad de IF1: la fosforilación de la serina 39 del IF1 humano por una protein quinasa A (PKA) mitocondrial. La fosforilación de IF1 anula su capacidad para unirse a la H^+ -ATP sintasa. Solo el IF1 defosforilado se une e inhibe tanto la actividad hidrolasa como la sintasa del enzima. El estado de fosforilación de IF1 regula el flujo de la glucólisis aeróbica y la producción de ATP mediante OXPHOS en distintas situaciones celulares tales como la hipoxia o la progresión por el ciclo celular. Además, IF1 está en su estado defosforilado en carcinomas humanos sugiriendo la importancia del mismo para explicar el fenotipo tumoral. Es de destacar que el corazón de ratón contiene una fracción de IF1 defosforilado que se fosforila e inactiva ante una estimulación β -adrenérgica *in vivo*. IF1 defosforilado es también menos propenso a degradarse que el IF1 fosforilado. En conjunto los resultados de este estudio demuestran la amplitud de mecanismos que regulan de manera post-transcripcional la expresión de IF1 y su actividad, poniendo de manifiesto la función esencial de IF1 y de su forma defosforilada activa en la regulación de la producción de ATP y el metabolismo energético.

Abreviaturas

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana de la mitocondria
Aa	Aminoácidos
ACP	Adenocarcinoma de pulmón
AEBSF	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato
AMP/ADP/ATP	Adenina 5' mono/di/trifosfato
ANT	Adenín-nucleótido translocasa
Ant A	Antimicina A
AKAPs	<i>A-kinase anchor proteins</i> , proteínas de anclaje de quinasa A
BEC	Índice Bioenergético Celular
BSA	Albúmina de suero bovino
CaM	Calmodulina
cAMP	AMP cíclico
CCR	Carcinoma colorrectal
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> , inmunoprecipitación de cromatina
CiP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i> , fosfatasa de intestino de ternera
CM	Carcinoma de mama
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
COX	Citocromo c oxidasa
CSP	Carcinoma escamoso de pulmón
CTE	Cadena de transporte electrónico
CTR	Control

db-cAMP	Dibutiril-AMP cíclico
2-DG	2-desoxiglucosa
DMOG	Dimetiloxaloilglicina
DNP	2,4-Dinitrofenol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido, reducido
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonil-ciadina-p-trifluorometoxifenil hidrazona
Frsk	Forskolina
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
G3BP	<i>GTPase activating protein (SH domain) binding protein</i> , proteína de union a la proteína activadora de GTPasa
H ⁺	Protón
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
Hsp60	60KDa Heat shock protein
IER3	<i>Immediate early response gene 3</i> , gen de respuesta temprana inmediata 3
IF1	<i>Inhibitory Factor 1</i> , factor inhibitorio 1
IgG	Inmunoglobulina
IP	Inmunoprecipitación
iPS	<i>induced Pluripotent Stem (cells)</i> , (células) pluripotentes inducidas

LDH	Lactato Deshidrogenasa
LRPPRC	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein</i> , proteína con motivo PPR rico en leucina
MDVs	<i>Mitochondria Derived Vesicles</i> , vesículas derivadas de mitocondria
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> , fibroblastos embrionarios de rató
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
mRNP	Ribonucleopartícula
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD ⁺ /NADH	Nicotidamida-adenina dinucleótido oxidado/reducido
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OL	Oligomicina
O-phe	O-fenantrolina
OSR	Respiración sensible a oligomicina
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Tampón fosfato salino
PET	Tomografía de emisión de positrones
pI	Punto isoelectrico
P _i	Fósforo inorgánico
PK	Piruvato quinasa
PKA	proteín quinasa dependiente de cAMP
PKI	Fragmento inhibidor de proteín quinasa 6-22
PTP	Poros de permeabilidad transicional

RNABP	<i>RNA-Binding Protein</i> , Proteína de unión a RNA
RIP	<i>RNA Immunoprecipitation</i> , Inmunoprecipitación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ROSmt	Especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial
ROT	Rotenona
rRNA	RNA ribosomal
SDH	Succinato Deshidrogenasa
SDS	Sodiododecilsulfato
SEM	Error estándar de la media
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> , RNA de horquilla corta
siRNA	RNA de silenciamiento
TCA	Tricloroacético
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i> , factor de crecimiento transformante beta
tRNA	RNA de transferencia
u.a.	Unidades arbitrarias
UTR	Región no traducida
V ₀	Velocidad inicial
VV	Vector Vacío
Wt	<i>Wild type</i> , genotipo salvaje

ÍNDICE

SUMMARY

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. La mitocondria.	18
1.1.1. Relación estructura-función mitocondrial.	18
1.1.2. Funciones de la mitocondria.	19
1.1.3. Biogénesis y homeostasis mitocondrial.	21
1.1.4. Control post-transcripcional del mRNA.	23
1.1.5. Modificaciones post-traduccionales en la mitocondria.	24
1.1.6. Mitocondria y cáncer.	25
1.2. La H⁺-ATP sintasa.	27
1.2.1. Estructura y Función.	27
1.2.2. Regulación.	29
1.3. IF1, el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa.	31
1.3.1. Isoformas y homología.	31
1.3.2. Estructura de IF1 e interacción con la sintasa.	32
1.3.3. Oligomerización de IF1 y de la H ⁺ -ATP sintasa.	33
1.3.4. Efecto de IF1 en la actividad sintética de la H ⁺ -ATP sintasa.	35
1.3.5. Funciones de IF1.	36
1.3.6. Regulación de IF1.	38
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Material.	43
3.1.1. Muestras humanas.	43
3.1.2. Líneas celulares.	43
3.1.3. Ratones.	44
3.1.4. Cepas bacterianas.	44
3.1.5. Plásmidos.	44
3.1.6. Oligonucleótidos.	44
3.1.7. Anticuerpos.	46
3.1.8. Radioisótopos.	47
3.1.9. Inhibidores y compuestos.	47
3.1.10. siRNAs y miRNAs.	47
3.2. Métodos.	47
3.2.1. Biología molecular.	47
3.2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos	47
3.2.1.2. Transformación de células <i>E. coli</i> competentes.	47
3.2.1.3. Purificación de proteínas recombinantes.	48
3.2.1.4. RT-PCR.	48
3.2.1.5. PCR cuantitativa (qPCR).	49

3.2.1.6.Mutagénesis dirigida de sitios de unión de miRNAs y de mutantes de IF1.	49
3.2.2.Métodos de Bioquímica.	49
3.2.2.1.Extracción y cuantificación de proteína en muestras biológicas.	49
3.2.2.2.Extracción de RNA y miRNA de muestras de células y tejidos.	50
3.2.2.3.Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE).	50
3.2.2.4.Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida.	51
3.2.2.5.Ensayo quinasa <i>in vitro</i> .	51
3.2.2.6.Detección inmunológica de proteínas (<i>Western blot</i>).	51
3.2.2.7.Defosforilación de proteínas.	52
3.2.2.8.Phosphate-affinity (Phos-Tag) electroforesis.	52
3.2.2.9.Purificación e identificación de proteínas de unión al mRNA de β -F1-ATPasa.	52
3.2.3.Biología celular	53
3.2.3.1.Cultivo de líneas celulares.	53
3.2.3.2.Tratamientos celulares.	53
3.2.3.3.Transfección transitoria de plásmidos, siRNAs y miRNAs.	54
3.2.3.4.Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo.	54
3.2.3.4.1.Velocidad de síntesis de proteínas <i>in vivo</i> .	54
3.2.3.4.2.Estudio del recambio de proteínas mediante pulso y caza.	55
3.2.3.5.Inmunoprecipitación (IP).	55
3.2.3.6.Inmunoprecipitación de RNA (RIP).	56
3.2.3.7.Medida del flujo glucolítico.	57
3.2.3.8.Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa.	57
3.2.3.9.Citometría de flujo.	58
3.2.3.9.1.Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio.	58
3.2.3.9.2.Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno.	58
3.2.3.10.Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.	59
3.2.3.11.Ensayo de la actividad promotora de ATP1F1.	59
3.2.3.12.Ensayo de eficiencia traduccional regulada por el 3'UTR de IF1.	60
3.2.3.13.Aislamiento de mitocondrias de líneas celulares.	60
3.2.3.14.Determinación de la actividad ATP hidrolasa de mitocondrias aisladas de células o tejidos de ratón.	60
3.2.3.15.Determinación de la actividad ATP sintasa de células permeabilizadas o de mitocondrias aisladas de células o tejidos de ratón.	61
3.2.4.Métodos en ratones	62
3.2.4.1.Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones.	62
3.2.4.2.Modulación adrenérgica <i>in vivo</i> .	62
3.2.4.3.Extracción de órganos de ratón.	62
3.2.4.4.Aislamiento de mitocondrias de órganos de ratón.	62
3.2.4.5.Ensayos de degradación en mitocondria aislada.	63
3.2.5.Métodos estadísticos	63
3.2.5.1.Estadística aplicada.	63

4. RESULTADOS 65

4.1. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE IF1. 65

4.1.1.Estructura génica y promotor de IF1.	65
4.1.2.Análisis de la expresión del mRNA de IF1 en cáncer.	68

4.1.3.Expresión mayoritaria de la isoforma 1 de IF1 en tejido normal y tumoral.	69
4.1.4.IER3 y la hipoxia no afectan la expresión de IF1.	70
4.1.5.Regulación de la expresión de IF1 por unión de proteínas de unión a su mRNA: La proteína LRPPRC.	71
4.1.6.Regulación post-transcripcional por microRNAs.	74
4.1.7.Regulación de la expresión de IF1 por control del recambio proteico (degradación).	78
4.1.8.El estrés oxidativo disminuye los niveles de IF1.	82
4.2. MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE IF1.	85
4.2.1.IF1 está fosforilado en líneas celulares de carcinomas humanos.	85
4.2.2.La fosforilación de IF1 es PKA-dependiente.	87
4.2.3.La defosforilación de IF1 promueve su unión al complejo F1-ATPasa.	89
4.2.4.IF1 defosforilado inhibe tanto la actividad hidrolasa como sintasa de la H ⁺ -ATP sintasa.	89
4.2.5.La fosforilación de serina 39 regula la actividad de IF1.	91
4.2.6.La defosforilación de IF1 promueve la glucólisis aerobia.	93
4.3. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE IF1.	94
4.3.1.Reprogramación metabólica por inhibidores.	94
4.3.2.Reprogramación metabólica durante el ciclo celular.	95
4.3.3.Reprogramación metabólica por hipoxia.	96
4.3.4.Reprogramación metabólica en cáncer.	98
4.3.5.Reprogramación metabólica <i>in vivo</i> por demanda energética.	99
4.3.6.IF1 defosforilado es más estable que el IF1 fosforilado.	102
5. DISCUSIÓN.	105
5.1. Regulación de la expresión de IF1.	105
5.2. Regulación de la actividad de IF1 y su relevancia fisiológica.	114
6. CONCLUSIONES.	121
7. REFERENCIAS.	122
ANEXO	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fosforilación oxidativa en la mitocondria.	20
Figura 2. Homeostasis proteica en la mitocondria.	22
Figura 3. La H^+ -ATP sintasa y su inhibidor fisiológico IF1.	31
Figura 4. Mecanismos de inhibición de la H^+ -ATP sintasa.	39
Figura 5. Datos compilados del UCSC Genome Browser en el área cromosómica que contiene el gen ATP1F1.	66
Figura 6. Potenciales factores de transcripción del promotor de ATP1F1.	67
Figura 7. La sobreexpresión de IF1 en carcinomas humanos prevalentes no se debe a cambios en mRNA.	68
Figura 8. La isoforma 1 de IF1 es la mayoritaria en tejido normal y tumoral así como en líneas celulares.	69
Figura 9. La expresión de IER3 y la hipoxia no cambian los niveles estacionarios de IF1.	71
Figura 10. La proteína LRP130 se une al mRNA de IF1.	73
Figura 11. miRNAs y efecto en la expresión de IF1.	75
Figura 12. miR-24-3p inhibe la traducción por interacción con el 3'UTR de IF1.	76
Figura 13. Los niveles de miR-24-3p están aumentados en corazón de ratones transgénicos que no consiguen expresar IF1.	77
Figura 14. IF1 es una proteína de vida media corta.	78
Figura 15. La degradación de IF1 depende de serín-proteasas y es tipo celular específica.	79
Figura 16. Screening de silenciamiento para la identificación de proteasas implicadas en la degradación de IF1.	80
Figura 17. YME1L participa en la degradación mitocondrial de IF1.	82
Figura 18. Los ROS mitocondriales producidos por la Antimicina A disminuyen los niveles de IF1.	83
Figura 19. El tratamiento con antimicina A produce un arresto traduccional selectivo de IF1.	85
Figura 20. IF1 está fosforilado en líneas tumorales humanas.	86
Figura 21. PKA fosforila IF1.	88
Figura 22. IF1 defosforilado se une e inhibe las actividades hidrolasa y sintasa de la H^+ -ATP sintasa.	90
Figura 23. La fosforilación de S39 regula la actividad de IF1.	92
Figura 24. La defosforilación de IF1 reprograma el metabolismo energético.	94
Figura 25. IF1 y las vías de provisión energética.	95
Figura 26. El estado de fosforilación de IF1 cambia con el ciclo celular.	96
Figura 27. La hipoxia desencadena la defosforilación de IF1 y la inhibición de la ATP sintasa.	97
Figura 28. IF1 está defosforilado en carcinomas humanos.	98
Figura 29. La estimulación in vivo de PKA promueve la fosforilación de IF1 y su inactivación como inhibidor.	100
Figura 30. La fosforilación de IF1 por PKA es intramitocondrial.	101
Figura 31. IF1 defosforilado es más estable que el IF1 fosforilado.	103
Figura 32. La fosforilación de IF1 define su degradación.	108
Figura 33. Regulación de la expresión de IF1.	111
Figura 34. El residuo S39 se encuentra en la zona de interacción con la FI-ATPasa.	115
Figura 35. La fosforilación por PKA de IF1 determina la obtención de ATP por fosforilación oxidativa.	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados.	46
Tabla 2. Anticuerpos utilizados.	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana presente en la mayor parte de las células eucariotas cuya función principal es la producción de la energía metabólica necesaria para el funcionamiento de las mismas (Mitchell, 1961). Sin embargo ésta no es su única función y también se considera vital en otros aspectos celulares de importancia como la homeostasis del calcio (Rizzuto et al., 2012) o el desencadenamiento de la muerte celular o apoptosis (Green et al., 2014). La mitocondria posee un genoma propio y, aunque la mayor parte de las proteínas del orgánulo están codificadas en el núcleo, la expresión de las proteínas codificadas en la mitocondria es vital para el funcionamiento del orgánulo.

1.1.1.Relación estructura-función mitocondrial.

Una de las características principales de la mitocondria es su alto dinamismo y variabilidad dependiendo del tipo celular. Estructura y función están estrechamente relacionadas, presentando los distintos tejidos según su funcionalidad mayor o menor número de mitocondrias, con una cantidad variable de crestas, una elongación también dependiendo de la especialización del tejido y de manera general un perfil proteómico muy variable tanto cualitativa (Mootha et al., 2003a) como cuantitativamente (Forner et al., 2006; Forner et al., 2009).

Las mitocondrias son orgánulos citosólicos cuya localización varía con los requerimientos energéticos de la célula, cambiando sus coordenadas subcelulares según las necesidades metabólicas de cada célula. Los contactos con proteínas del citoesqueleto son constantes e importantes tanto para su mantenimiento normal (Anesti and Scorrano, 2006) como para motilidad tipo celular específica (Hollenbeck and Saxton, 2005). En este contexto son también importantes los sitios de contacto de la mitocondria con el retículo endoplásmico (Hayashi et al., 2009) a través de complejos proteicos como el ERMES (Kornmann and Walter, 2010) para la correcta homeostasis del calcio y la biogénesis de lípidos.

La mitocondria, de acuerdo a su origen endosimbionte, está compuesta de dos membranas lipídicas muy distintas funcionalmente y que delimitan tres compartimentos celulares diferenciados: el citosol, el espacio intermembrana (EM) y la matriz mitocondrial. La existencia de dos membranas y tres compartimentos distintos dota al orgánulo de la capacidad de llevar a cabo funciones y procesos metabólicos muy específicos y de manera eficiente. La membrana externa mitocondrial (ME) intercala proteínas con fosfolípidos de manera similar a la membrana plasmática y su función es la de actuar como barrera de entrada a metabolitos, otras proteínas o lípidos, así como del contacto con otros orgánulos. La membrana interna mitocondrial (MI), por su parte, tiene

una composición más cercana a una membrana bacteriana y se caracteriza por estar extensamente compartimentalizada en invaginaciones de sí misma llamadas crestas mitocondriales que se unen a la membrana externa mitocondrial por medio de zonas de membrana interna periférica llamadas *crista junctions*. La invaginación en crestas aumenta muy significativamente la superficie total de membrana interna generando así mucha más superficie funcional respiratoria. La formación y remodelamiento de las crestas mitocondriales depende de muchos factores (Zick et al., 2009), entre ellos la ATP sintasa la cual, en su forma dimérica, puede agruparse generando una curvatura de la MI promoviendo así la formación de crestas (Davies et al., 2012; Paumard et al., 2002).

Además de su estructura individual, la mitocondria también forma una red dinámica de todo su conjunto en la célula que integra las necesidades metabólicas y energéticas de manera fina y flexible (Rafelski, 2013) valiéndose de los fenómenos de fisión (dependiente de Drp1 y Fis1) y fusión (con el eje proteico de mitofusinas Mfn1/Mfn2 y Opa1) mitocondriales (Twig et al., 2008).

1.1.2. Funciones de la mitocondria.

La función principal de la mitocondria es la generación de energía metabólica a través de la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i). Este proceso endotérmico requiere de energía y se produce por el acoplamiento de la respiración mitocondrial que acaba en la reducción de O_2 en un proceso conocido como fosforilación oxidativa. En este proceso, los complejos proteicos que forman la cadena de transporte electrónico (CTE) oxidan donadores de electrones generados en procesos catabólicos (NADH y el $FADH_2$ de la matriz, principalmente) y transfieren estos e^- hasta el paso final de reducción del oxígeno molecular. En esta transferencia electrónica los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria bombean protones H^+ fuera de la matriz y generan el gradiente electroquímico de protones H^+ . Este gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz es utilizado por el complejo V o ATP sintasa, el cuello de botella de la fosforilación oxidativa, que se vale del gradiente para sintetizar ATP (Mitchell and Moyle, 1965).

El funcionamiento de la CTE, además del gradiente electroquímico de protones y producción de ATP, conlleva la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por desvío prematuro de electrones al oxígeno por parte de los complejos I y III (Balaban et al., 2005). El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y su derivado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son moléculas con una importante función señalizadora (D'Autreaux and Toledano, 2007) que, en exceso, son perjudiciales para la célula. Es en ese equilibrio entre señal de estrés oxidativo leve y una más fuerte donde parece radicar la función reprogramadora a nivel nuclear de todo el programa celular por parte de la mitocondria (Yun and Finkel, 2014).

Otras funciones de la mitocondria aparte de la generación de ATP y la señalización nuclear son la ejecución de la muerte celular, la señalización por calcio, el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, procesos del metabolismo celular como el ciclo tricarboxílico, y la producción del grupo hemo o de precursores del ciclo de la urea y la gluconeogénesis.

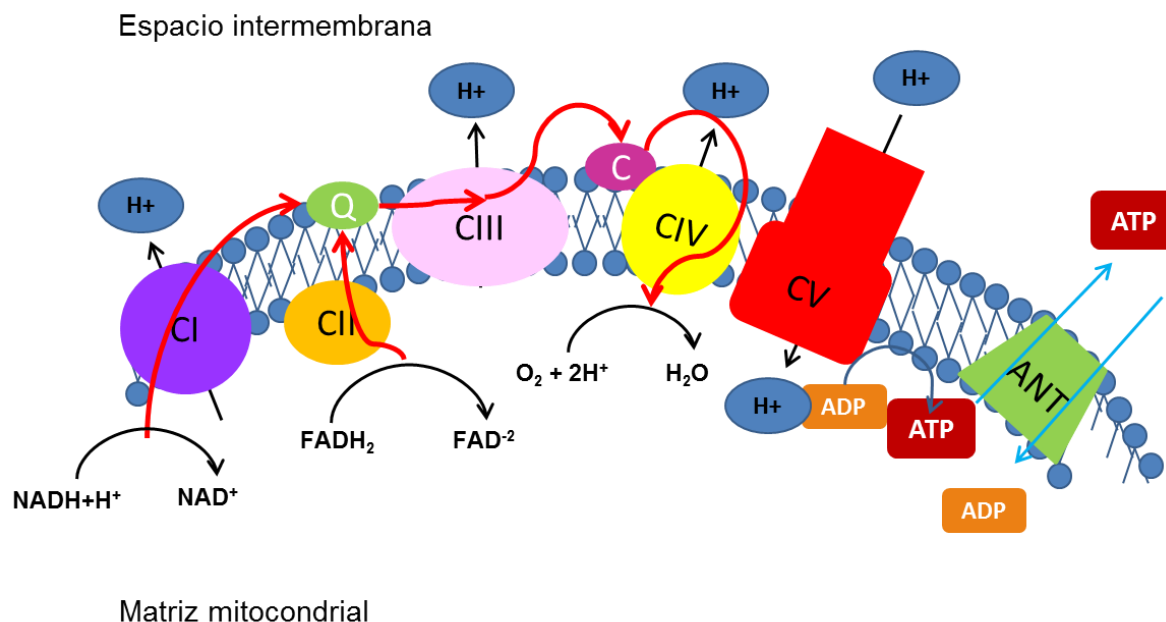


Figura 1. Fosforilación oxidativa en la mitocondria. El diagrama muestra los 5 complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE) y la translocación de protones (H^+) hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que el complejo V usa para generar ATP a partir de ADP y P_i . Las flechas rojas indican el camino de los electrones a partir de NADH o succinato por los complejos hasta llegar al O_2 . El translocador de nucleótidos de adenina (ANT) se encarga de sacar fuera de la mitocondria el ATP sintetizado y meter ADP que sirva de sustrato. CI: NADH deshidrogenasa; CII: succinato deshidrogenasa; CIII: citocromo bc_1 ; CIV: citocromo c oxidasa; CV: H^+ -ATP sintasa; C: citocromo c; Q: coenzima Q.

Recientemente se ha demostrado que el modelo clásico de la CTE se ve complementado por un sistema de ensamblaje de los complejos en supercomplejos o respirasomas (Schagger and Pfeiffer, 2000) con el fin de disminuir la generación de ROS por una mejor transferencia electrónica. La importancia de este modelo de funcionamiento se pone de manifiesto por la existencia de respirasomas funcionales que transfieren electrones desde el NADH hasta el O_2 (Acin-Perez et al., 2008) y que incluso responden a las distintas necesidades energéticas (Lapiente-Brun et al., 2013) o estructurales (Cogliati et al., 2013) de la célula.

1.1.3. Biogénesis y homeostasis mitocondrial.

La mitocondria es un orgánulo semi-autónomo, ya que posee su propio genoma circular que codifica para 13 proteínas esenciales de los complejos respiratorios, 22 tRNAs y dos rRNA (Calvo and Mootha, 2010). La mayoría de su proteoma, sin embargo, está codificado en el núcleo y se sintetiza en el citosol siendo posteriormente importado a la mitocondria (Chacinska et al., 2009) o siguiendo un proceso de importación co-translacional (Williams et al., 2014). La regulación espaciotemporal de la biogénesis mitocondrial se consigue por la coordinación de factores de transcripción sensibles a estímulos como la disponibilidad de nutrientes, hormonas, factores de crecimiento o incluso las fluctuaciones de temperatura. Destacan en este grupo el factor de transcripción PGC1- α , los receptores de estrógenos ERR (α , β , γ) y los factores respiratorios nucleares (NRF1 y NRF2) (Hock and Kralli, 2009). Hay que destacar la importancia de la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial (Scarpulla, 2008). En la base de este programa celular de biogénesis mitocondrial se encuentran rutas de señalización entre las que destacan la de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Hardie, 2011), la regulada por calcio quinasa calcio/calmodulina-dependiente (CaMK) (Wu et al., 2002) o la ruta de mTOR (Cunningham et al., 2007).

No solo es necesario un control de la biogénesis mitocondrial sino también un mantenimiento de las mitocondrias en un estado óptimo para su funcionamiento, así como una eliminación regulada de aquellas que estén dañadas o sean innecesarias para la célula. El control de calidad del proteoma mitocondrial es monitorizado por chaperonas mitocondriales que ayudan al correcto pliegue de las proteínas en su estructura terciaria, y por proteasas mitocondriales cuya función básica es degradar aquellas proteínas que no se pliegan u oligomerizan apropiadamente (Tatsuta and Langer, 2008). Los daños acumulados en el mtDNA o en las subunidades proteicas por parte de los ROS pueden afectar al plegamiento proteico y al ensamblaje de la CTE. El primer punto de control de la mitocondria es la degradación por parte de proteasas AAA (dependientes de ATP) (Sauer et al., 2004), presentes en todos los compartimentos mitocondriales: así la matriz contiene las serín-proteasas solubles CIPXP (Haynes et al., 2007) y Lon (Bota and Davies, 2002; Lu et al., 2013). Por su parte, el espacio intermembrana es monitorizado por la serín-proteasa HtrA2 (Vande Walle et al., 2008), mientras que la membrana interna contiene dos proteasas AAA: por un lado el complejo homo-oligomérico de YME1L (Rainbolt et al., 2013), y el hetero-oligomérico compuesto por paraplegina (SPG7) y AFG3L2 (Hornig-Do et al., 2012). Otras proteasas como la romboide PARL o la peptidasa PMPCB fijan su función en la escisión de la señal de importación mitocondrial presente en la mayor parte de las proteínas dirigidas al orgánulo. Además de las ya mencionadas, aún se están describiendo nuevos miembros de esta familia de mitoproteasas así como funciones

emergentes (Quiros et al., 2015). Defectos en el contenido de estas proteasas producen defectos en la CTE y en concreto pueden afectar a los niveles de la ATP sintasa: así la eliminación de Htra2 en ratón trunca la subunidad a de la porción F₁ produciendo un aumento de la translocación de protones (Plun-Favreau et al., 2012) y el defecto en Lon afecta de manera profunda a los complejos I y V (Quiros et al., 2014). Respecto a las proteínas en la membrana externa mitocondrial, parece que es el sistema del proteasoma el que se encarga de la eliminación de aquéllas que fallan en ser importadas o que no se pliegan adecuadamente (Karbowski and Youle, 2011).

Cuando el sistema de degradación intramitocondrial es superado la célula presenta un programa adaptativo conocido como la respuesta a proteínas no plegadas (Unfolded protein response, UPR_{mt}), promovido por el incremento fisiológico en la carga proteica no plegada. Esta respuesta a estrés radica en la transducción de una señal que resulta en la inducción de genes protectores mitocondriales codificados en el núcleo incluyendo chaperonas moleculares y proteasas con el fin de restablecer la homeostasis proteica en el orgánulo (Haynes and Ron, 2010).

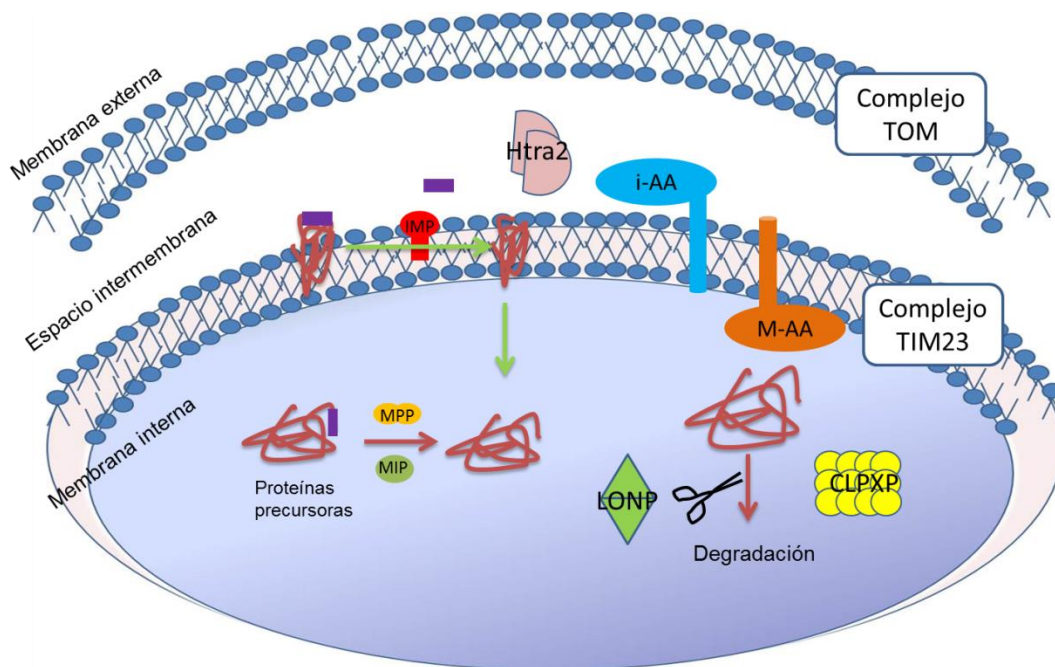


Figura 2. Homeostasis proteica en la mitocondria. Las proteasas mitocondriales degradan proteínas tanto en el espacio intermembrana como en la matriz. Las serín-proteasas CLPP con su subunidad de unión a ATP CLPX (CLPXP) y la proteasa Lon (LONP) en la matriz mitocondrial. Otra serín-proteasa, Htra2, degrada proteínas no plegadas o dañadas en el espacio intermembrana, al igual que las proteasas transmembrana i-AAA y m-AAA que degradan proteínas de la membrana interna. Se incluyen en el esquema las proteasas de procesamiento de proteínas mitocondriales IMP en la membrana interna y MPP y MIP en la matriz, así como los complejos de importación mitocondrial TOM y TIM23.

Como medida irreversible post-homeostasis se encuentra el proceso de eliminación autofágica de mitocondrias enteras, la denominada mitofagia. En la mitofagia, desencadenada por la presencia de mitocondrias dañadas o en excesivo número, el orgánulo es secuestrado en vesículas de doble membrana, los autofagosomas, y enviado a su fusión con el lisosoma para su degradación completa (Youle and Narendra, 2011). Este proceso depende de dos proteínas, la proteína de membrana mitocondrial externa PINK1 (quinasa putativa inducida por PTEN 1) y la citosólica E3-ubiquitín ligasa Parkin. PINK1 es una Ser/Thr quinasa que se acumula específicamente en mitocondria despolarizada (por lo general mitocondria defectuosa) reclutando Parkin por fosforilación y, en concreto, aumentando su capacidad catalítica por fosforilación también de ubiquitina (Koyano et al., 2014), de manera que la cantidad de proteínas ubiquitinadas aumenta (Sarraf et al., 2013) y se marca la mitocondria para el avance en el proceso de mitofagia. Aunque la mitofagia ha sido generalmente descrita como un proceso irreversible y que engloba mitocondrias enteras, recientemente se han descrito procesos muy selectivos de degradación de determinados componentes de la CTE (Vincow et al., 2013) o de vesiculación de fragmentos mitocondriales especialmente oxidados en vesículas derivadas de mitocondria (MDVs) (McLelland et al., 2014), todo ello indicando que hay procesos intermedios encaminados a la preservación mitocondrial salvo daño irreversible.

1.1.4. Control post-transcripcional del mRNA.

Un proceso importante para las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo es el transporte y localización de estos mRNAs nucleares en las proximidades de la mitocondria (Sylvestre et al., 2003). En el proceso participan el citoesqueleto, proteínas de unión a RNA y elementos reguladores en *cis* que forman parte del mRNA y que suelen encontrarse principalmente en la región 3' no traducida (3' UTR) (Martin and Ephrussi, 2009) aunque también pueden aparecer en el 5'UTR (Tsai et al., 2007) o en regiones codificantes (Ricart et al., 2002) generando una regulación espacio-temporal muy fina y específica para cada mRNA.

Además de la localización de los mRNAs, también es muy importante el control de la estabilidad de éste así como su eficiencia de traducción. Unos actores importantes en este proceso son las proteínas de unión a RNA (RBPs) (Lunde et al., 2007) que integran complejos consistentes en proteínas, mRNAs y RNAs no codificantes que en conjunto se llaman partículas ribonucleoproteicas (mRNP). Las RBPs pueden afectar tanto la tasa de degradación del mRNA al que se unen así como aumentar o disminuir la traducción del mismo en proteína. Además, entre estos RNAs no codificantes se encuentran unos RNAs muy pequeños de unos 23 nucleótidos llamados microRNAs (miRNAs). Gracias a su apareamiento imperfecto con una secuencia del

mRNA diana que por lo general está en el 3'UTR, y por medio del llamado complejo silenciador inducido por RNA (RISC), los miRNAs son elementos reguladores en *cis* muy importantes. Los pre-miRNAs se pliegan en horquillas que actúan como sustrato para dos miembros de la familia de enzimas RNasa III, Drosha y Dicer. Ambas procesan secuencialmente al precursor generando el dúplex miRNA/miRNA* de alrededor de 20 nucleótidos. Una de las dos hebras, que representará el miRNA maduro, se incorpora en el complejo con RISC y proteínas importantes como las Argonautas (Krol et al., 2010), y, gracias al apareamiento imperfecto con los mRNA diana, por lo general inhiben la síntesis de estas proteínas por represión traduccional o por deadenilación del mRNA y su posterior degradación (Houseley and Tollervey, 2009). El apareamiento eficiente de la secuencia del miRNA maduro y del 3'UTR del mRNA no solo depende de la similitud en sus secuencias sino que también se ve afectado por múltiples factores como la riqueza en nucleótidos AU cerca del sitio de unión, proximidad a otros sitios de unión de miRNAs co-expresados (efecto cooperativo en la unión), que la secuencia de apareamiento se encuentre entre los nucleótidos 13-16 del miRNA maduro, posicionamiento del sitio de unión a menos de 15 nucleótidos del codon stop y, finalmente, que no se encuentre en la zona central de UTRs largos (Grimson et al., 2007).

1.1.5. Modificaciones post-traduccionales en la mitocondria.

Las modificaciones covalentes suponen un plano más de regulación a nivel de proteína, y tanto en núcleo como en citoplasma están perfectamente establecidas como reguladoras potenciales de la actividad, la estabilidad y la localización subcelular de muchas proteínas, así como de afectar a las interacciones proteína-proteína. Más recientemente se ha descrito cómo distintos procesos metabólicos están regulados por modificaciones covalentes afectando a un gran porcentaje de proteínas mitocondriales: así, la determinación del fosfoproteoma del hígado de ratón revela su importancia en la cetogénesis (Grimsrud et al., 2012), mientras que según algunos estudios la acetilación en residuos lisina parece poder darse en más del 20% de proteínas mitocondriales regulando así múltiples procesos. Aunque la mayor parte del mitoproteoma está codificado en el núcleo y por lo tanto se puede dar en el citoplasma previo a la importación mitocondrial, la descripción de que proteínas generadas por el mtDNA como las subunidades COX del complejo IV se someten a procesos de fosforilación (Acin-Perez et al., 2011; Acin-Perez et al., 2009; Miyazaki et al., 2003) evidencia la existencia de una red de enzimas intramitocondriales a nivel de fosforilación (Pagliarini and Dixon, 2006). Asimismo, también se ha observado la presencia de quinasas como la protein quinasa dependiente de cAMP (PKA) o casein quinasa en complejos proteicos unidos a la membrana externa mitocondrial (Gerbeth et al., 2013). Para la presencia de quinasas no esencialmente mitocondriales dentro o en los alrededores de la mitocondria juegan un papel muy importante las llamadas A-kinase anchor proteins (AKAPs) (Wong and Scott, 2004).

Proteín-quinasas descritas en la mitocondria, además de PKA (Sardanelli et al., 2006), destacan la ya mencionada PINK1 y las tirosín-quinasas de la familia Src (Salvi et al., 2005). La tirosín-quinasa Fgr no solo se ha descrito dentro de la mitocondria sino que además su actividad sobre la subunidad catalítica del complejo II (FpSDH) aumenta la actividad del complejo y de la fosforilación oxidativa (Acin-Perez et al., 2014).

Pero además de proteínas presentes también en el citoplasma, hay enzimas dedicadas a modificar covalentemente otras proteínas y que se encuentran exclusivamente dentro de la mitocondria: a nivel de fosforilación es muy llamativa la existencia de la protein tirosín-fosfatasa localizada en mitocondria (PTPMT1) cuyo silenciamiento afecta a la fosforilación de múltiples proteínas de manera intramitocondrial (Pagliarini et al., 2005) con una destacada función en la diferenciación hematopoyética (Yu et al., 2013).

Aún no se han descrito qué enzimas son las encargadas de acetilar proteínas, en caso de que fuera un proceso enzimático y no uno espontáneo derivado de las altas concentraciones locales de acetil-CoA. Sin embargo las enzimas que realizan el proceso reverso, es decir las deacetilasas, han sido fruto de numerosas investigaciones centrándose sus efectos en el núcleo y en la mitocondria. De localización mitocondrial, la NAD^+ -dependiente protein-deacetilasa SIRT3 se encarga de deacetilar lisinas afectando prácticamente a todas las funciones mitocondriales, desde la producción de ROS a la fosforilación oxidativa (He et al., 2012). Otros dos miembros de la familia de las sirtuinas poseen localización mitocondrial y, aunque en principio también se pensaba que eran deacetilasas, recientemente se ha descrito que su actividad deacetilasa es muy baja, casi marginal. SIRT4 por su parte ha sido relacionada con actividad lipoamidasa regulando la actividad del complejo de piruvato-deshidrogenasa (Mathias et al., 2014), mientras que SIRT5 posee una potente y exclusiva actividad desuccinilasa (Rardin et al., 2013a) que afecta a lisinas distintas a las que sufren acetilación y a diversas rutas metabólicas (Park et al., 2013).

1.1.6. Mitocondria y cáncer.

Recientemente se ha incluido la reprogramación del metabolismo energético, o efecto Warburg, como una de las características esenciales para que se dé el proceso tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Este metabolismo aberrante de las células tumorales consiste en un alto perfil glucolítico incluso en presencia de oxígeno, un fenómeno conocido como glucólisis aeróbica (Warburg, 1956) que ha sido evidenciado por diferentes estudios (Cuezva et al., 2009) y que se ha traducido incluso en una técnica de diagnóstico y pronóstico como es la tomografía de emisión de positrones (PET) que tiene su base en el elevado consumo de glucosa de los tumores (Lopez-Rios et al., 2007). Muchos tipos celulares utilizan esta glucólisis aeróbica durante la proliferación, lo que le

sugiere un papel fundamental en el crecimiento celular (Brand and Hermfisse, 1997; Sanchez-Arago et al., 2013b; Wang et al., 1976), hecho especialmente prevalente en tejidos embrionarios (Cuezva et al., 2007; Kondoh et al., 2007). La importancia de esta vía de obtención de energía parece radicar en el mantenimiento de altos niveles de intermediarios glucolíticos que sirvan en procesos anabólicos de generación de nuevas estructuras celulares para la proliferación celular como fin último (Lunt and Vander Heiden, 2011). Esta producción de esqueletos carbonados para obtener biomasa explicaría por qué el metabolismo aumentado de glucosa ha sido seleccionado en todo tipo de células proliferativas y cuál es la ventaja que obtienen de la glucólisis aeróbica, que es una manera menos eficiente de obtención de ATP. Este programa celular de proliferación se basa en rutas de señalización que controlan coordinadamente glucolisis, síntesis de aminoácidos, la vía de las pentosas fosfato, síntesis de nucleótidos, de lípidos, el ciclo de Krebs y glutaminolisis, a su vez movidas por genes supresores de tumores y oncogenes (Vander Heiden et al., 2009). La presencia de factores de crecimiento lleva tanto a la activación de la vía oncogénica de señalización por tirosín-quinazas así como de la PI3K. Por otro lado, el oncogén Myc controla el metabolismo de glutamina y la producción de NADPH. Las vías supresoras AMPK y p53, por su parte, se encargan de apagar estas vías metabólicas en situaciones de bajo aporte energético o de estrés oxidativo (Levine and Puzio-Kuter, 2010). El piruvato aparece como molécula central en el proceso glucolítico y así se evidencia por la importancia en el fenotipo tumoral de la presencia de la isoforma 2 de la piruvato quinasa (PKM2) (Chaneton and Gottlieb, 2012), no solo por su importancia en ser el enzima que realiza el paso final de la glucolisis sino también por su translocación nuclear activando la reprogramación y expresión de genes eminentemente glucolíticos por actuar de co-activador del eje β -catenina/Myc (Yang et al., 2012). Otras proteínas centrales para el fenotipo tumoral y sus correspondientes mutaciones son las isozimas de isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/2) que forman parte del ciclo TCA. Sobre estas tres proteínas, y muchas de sus compañeras en rutas metabólicas, se está desarrollando una estrategia de desarrollo de fármacos dirigidos a explotar estas vulnerabilidades metabólicas de un denominador común en cáncer (DeLaBarre et al., 2014).

Pese a esta clara preferencia glucolítica de las células tumorales de manera general, recientemente se ha hecho hincapié en distintos estudios en la posibilidad de que el fenotipo contrario, es decir una alta dependencia de la fosforilación oxidativa, esté teniendo un papel central en el proceso tumoral, siendo incluso erradicados cuando se trata con inhibidores respiratorios. Estas poblaciones celulares con alta capacidad respiratoria son en estos casos, de hecho, aquellas resistentes a distintos tratamientos farmacológicos (Roesch et al., 2013) o eliminación de oncogenes (Viale et al., 2014), suponiendo una subpoblación “durmiente” del tumor. De la misma

manera, un proceso importante dentro del cáncer como la metástasis parece también depender de la función mitocondrial y su biogénesis mediada por PGC1- α , habiendo una fuerte correlación entre su expresión en cánceres invasivos y en metástasis distantes (LeBleu et al., 2014) especialmente aquellas relacionadas con tipos tumorales específicos como los melanomas. Por último cabe destacar que el mtDNA es vital para la progresión tumoral y que la transferencia horizontal de mtDNA de células del individuo no tumorales en el microambiente tumoral a células tumorales ayuda a la eficacia de iniciación tumoral (Tan et al., 2015).

De cualquier manera todos los datos resaltan la importancia de la función mitocondrial y su función en metabolismo y obtención de energía como vitales para las distintas poblaciones tumorales y contextos celulares.

1.2. La H⁺-ATP sintasa.

1.2.1. Estructura y Función.

Las ATP sintasas poseen una estructura y arquitectura en forma de complejos multiproteicos que forman dos dominios funcionales principales: i) uno extrínseco a la membrana llamado F₁ ($\alpha_3\beta_3\gamma_1$) y ii) uno intrínseco a la membrana llamado F_o (c₈₋₁₀a₁), ambos unidos por un brazo periférico (b₁F₆d₁A₆L₁OSCP₁) y uno central ($\delta_1\epsilon_1$). En el dominio F₁ el subensamblaje de 3 α - y 3 β forma una estructura esférica con las seis subunidades alternadas envolviendo una estructura en α -hélice elongada de la subunidad γ que constituye el eje central del dominio. El resto de la subunidad γ forma parte de un pie que une el complejo firmemente al dominio F_o, gracias a las subunidades mitocondriales δ y ϵ . Esta estructura se une a una estructura cilíndrica hidrofóbica que consiste en un anillo de subunidades c, y es este cilindro junto a las subunidades γ , δ y ϵ la que forma el rotor del enzima.

La actividad catalítica de la H⁺-ATP sintasa se vale de la asimetría que le confiere a todo el complejo la subunidad γ , que obliga a que cada una de las subunidades β catalíticas adopte una conformación distinta con propiedades catalíticas y de unión a nucleótidos variables. Dos de ellas poseen conformaciones similares y pueden unirse o a ADP o a ATP (β_{DP} y β_{TP}). Una tercera subunidad (denominada β_E) adopta una conformación radicalmente distinta debido a la curvatura de la subunidad γ y su dominio de unión a nucleótido queda inutilizado. Las subunidades α por su parte permanecen cerradas sobre la estructura y no cambian su conformación durante el proceso catalítico ni hay diferencias entre cada una de ellas. Cada una de ellas une un ion Mg²⁺ y un nucleótido. La interconversión de subunidades β entre una conformación y otra se da por una rotación mecánica de la subunidad γ , cada rotación de 360° hace que cada una de las 3 subunidades

β pase por los 3 estados produciendo, dependiendo del sentido de rotación, la hidrólisis o síntesis de 3 moléculas de ATP (Walker, 2013). La síntesis de ATP dependerá del gradiente electroquímico de protones generado dentro de la mitocondria, mientras que en el proceso de hidrólisis la H^+ -ATP sintasa transloca H^+ al espacio intermembrana. El cilindro rotor de la ATP sintasa es el anillo de subunidades c, y para la rotación efectiva de 360° del anillo se requiere la translocación del mismo número de protones como subunidades c del anillo, es decir 8 protones. El coste bioenergético de un rotación completa de la H^+ -ATP sintasa en mamíferos es de 8 protones, 11 si contamos el que hay que translocar para el proceso de salida de cada molécula de ATP por $ADP + P_i$ externo a la mitocondria. El coste de generar un ATP citoplasmático por parte de la mitocondria y su ATP sintasa es por lo tanto de 3.7 protones/molécula de ATP. Hay que destacar que la función reversa de la H^+ -ATP sintasa que se da en situaciones hipóxicas y de despolarización mitocondrial tiene como objetivo el prevenir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial a costa del gasto de ATP.

Otra función emergente más allá de la síntesis de ATP es la regulación de la muerte celular: se ha descrito que la función de bombeo de protones de la H^+ -ATP sintasa es necesaria para la muerte celular desencadenada por Bax (Matsuyama et al., 1998), y que la proteína anti-apoptótica Bcl-xL interacciona con la β -F1-ATPasa para regular la eficiencia del metabolismo energético. Más allá de esto, muy recientemente se ha propuesto una función aún más central para la H^+ -ATP sintasa en la ejecución de la muerte celular ya que podría ser su estructura en forma de dímeros la que formara parte esencial del llamado poro de permeabilidad transicional (PTP) (Giorgio et al., 2013), un canal de alta conductancia dependiente de voltaje y de Ca^{2+} cuya apertura prolongada genera un aumento brusco de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a solutos de baja masa molecular. Este proceso conlleva una despolarización mitocondrial, inhibición de la respiración y generación de ROS, con liberación del Ca^{2+} de la matriz y finalmente el hinchamiento de la mitocondria y liberación de proteínas intermembrana, muchas de ellas con función pro-apoptótica (Bernardi, 1999; Rasola and Bernardi, 2007). Otros estudios sugieren que el PTP está formado por la ATP sintasa pero no por todo el complejo sino por precisamente el anillo de subunidades c que forma parte del dominio F_o (Alavian et al., 2014).

Un estudio reciente también destaca la función central de la H^+ -ATP sintasa en diferenciación de líneas germinales de células madre en ovario de *Drosophila* pero no como complejo central de la fosforilación oxidativa, sino por una función independiente de ésta y relacionada con la dimerización y maduración de las crestas mitocondriales (Teixeira et al., 2015). Por último, y dada la importancia de la mitocondria, la fosforilación oxidativa y los ROS en el

proceso de envejecimiento, la H^+ -ATP sintasa y en concreto su inhibición específica también tienen una función central en la prevención del envejecimiento (Chin et al., 2014).

1.2.2. Regulación.

Un rasgo característico de muchos tumores, como ya hemos dicho, es su disminuida fosforilación oxidativa. Siendo la H^+ -ATP sintasa y, en concreto, su subunidad catalítica β -F1-ATPasa el complejo y proteína limitantes de ésta, es de esperar que haya una regulación de ambas a nivel de proteína o a nivel de actividad para inhibir esta función de manera directa. En nuestro laboratorio se ha diseñado una aproximación proteómica que permite estudiar el efecto Warburg en tumores, conocido como el índice bioenergético celular (índice BEC). Este índice, que se expresa como la razón β F1ATPasa/Hsp60/GAPDH (Cuezva et al., 2002), estima de manera directa el potencial mitocondrial de la célula. La mayoría (> 97%) de los tumores humanos más prevalentes presentan un índice BEC disminuido, es decir, una disminución de la β F1-ATPasa y un incremento en marcadores glucolíticos (Cuezva et al., 2004; Cuezva et al., 2002), por lo que también se llama huella bioenergética del cáncer. Hay que destacar además que tumores de diferentes tejidos mantienen como característica común esta huella bioenergética (Acebo et al., 2009). Su utilidad como marcador pronóstico en carcinoma de pulmón, colon y mama (Cuezva et al., 2004; Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2005; Lin et al., 2008; Lopez-Rios et al., 2007) y como marcador predictivo de la respuesta a quimioterapia (Hernlund et al., 2009; Lin et al., 2008; Sanchez-Arago and Cuezva, 2011) refuerza la importancia de este índice proteico.

Los niveles proteicos de toda la ATP sintasa y en concreto de β F1ATPasa están regulados por diferentes mecanismos: la hipermetilación del gen *ATP5B* limita la expresión del mRNA y por lo tanto de la proteína en células de leucemia mieloide crónica (Li et al., 2010). De manera post-transcripcional, se ha descrito al menos una RBP, la proteína G3BP que, mediante interacción con el 3'UTR del mRNA, reprime su traducción y que se acumula en tumores de mama (Ortega et al., 2010). Asimismo, dos miRNAs parecen regular negativamente la eficiencia de traducción de la subunidad β F1: el miRNA miR-127-5p en desarrollo fetal humano (Willers et al., 2012) y el miR-101 relacionado con la respuesta antiviral ante HSV-1 (Zheng et al., 2011).

Otro plano regulador sobre la H^+ -ATP sintasa es a nivel de su ensamblaje y oligomerización. A este respecto, recientemente se ha identificado en *Saccharomyces cerevisiae* un factor de ensamblaje de la ATP sintasa como es el complejo INA (Lytovchenko et al., 2014). También se ha descrito el rol vital en el mantenimiento de este ensamblaje de la proteína de fusión OPA1 (Patten et al., 2014), y puesto de manifiesto la importancia de la proteína LRPPRC ya que su

eliminación en tejido cardíaco de ratón genera sub-ensamblajes de ATP sintasa inactivos que promueven la hiperpolarización y aumentan la producción de ROS (Mourier et al., 2014). Otro factor potencial que modula la dimerización de la H^+ -ATP sintasa y en concreto la inhibe según avanza el proceso de envejecimiento es la peptidil-prolil isomerasa ciclofilina D (Daum et al., 2013).

En relación al proceso de envejecimiento se ha visto que en *Drosophila* la ausencia de la subunidad d del complejo generaba moscas con vidas más largas incluso sometidas a dietas que generaban estrés oxidativo y todo ello debido a una actividad reducida de la ruta de mTOR (Sun et al., 2014). Esta inhibición conjunta con la ruta de mTOR y su importancia en la extensión de la esperanza de vida se pone también de manifiesto con la descripción de que la actividad de la ATP sintasa y como consecuencia la de mTOR es inhibida por el metabolito del ciclo TCA α -cetoglutarato (Chin et al., 2014) y por el oncometabolito (R)-2-hidroxiglutarato (Fu et al., 2015) por interacción directa con la subunidad $\beta F1$ en *Caenorhabditis elegans*.

La actividad de la H^+ -ATP sintasa y por lo tanto de la fosforilación oxidativa además de por metabolitos también puede ser regulada por modificaciones covalentes: la nitración de las tirosinas 345 y 368 de la subunidad $\beta F1$ -ATPasa produce una inhibición importante de las actividades hidrolasa y sintasa del complejo (Haynes et al., 2010). Esta misma subunidad también se regula negativamente por acetilación de las lisinas 259 y 480 en *Drosophila* (Rahman et al., 2014), mientras que la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OCSP) contiene un residuo (Lisina139) cuya acetilación también disminuye la actividad de síntesis del complejo en ratón (Vassilopoulos et al., 2014). En cuanto a fosforilaciones, se han descrito 67 sitios de fosforilación en 12 de las 16 subunidades del complejo V en mamíferos (Covian and Balaban, 2012). Sin embargo aún no se ha determinado la significancia funcional de ninguna de ellas.

Finalmente la regulación por proteínas o factores de unión: el llamado factor B es una proteína que llegó a considerarse parte de la ATP sintasa de mamíferos y que actuaría regulando de forma positiva su función (Belogrudov, 2009). Otro regulador positivo recientemente descrito es la proteína de inducción por hipoxia G0/G1 switch gene 2 (G0s2) que previene las células de la depleción de ATP (Kioka et al., 2014). Por último existe una proteína inhibidora fisiológica de la H^+ -ATP sintasa que es el factor inhibidor de la ATPasa 1 (IF1).

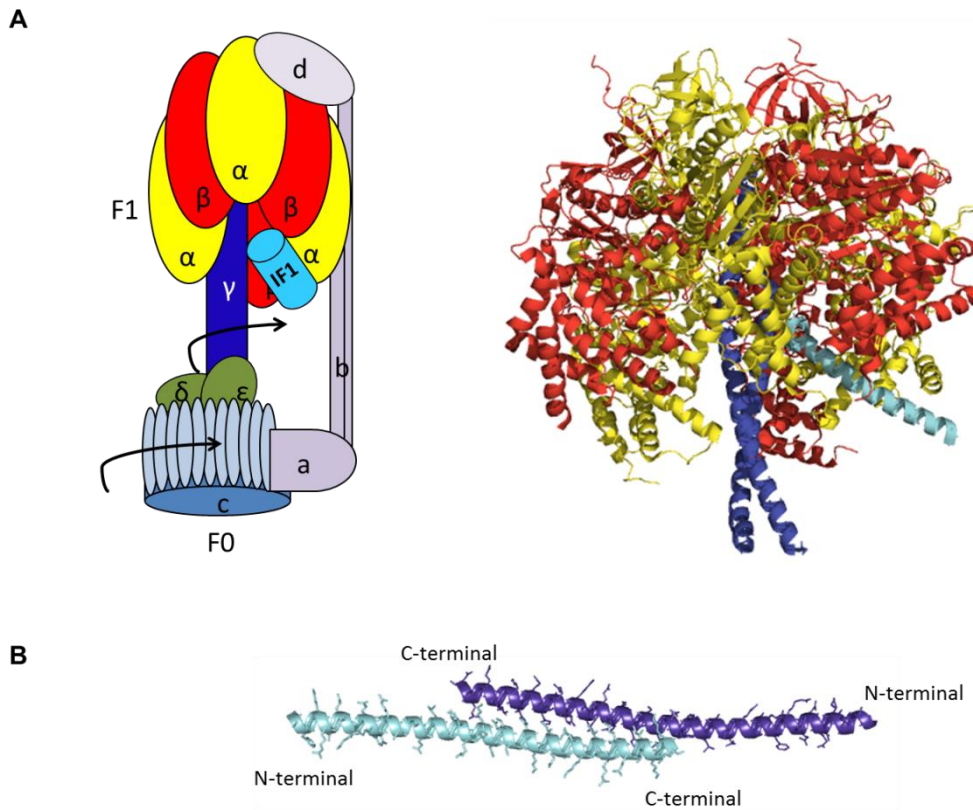


Figura 3. La H^{+} -ATP sintasa y su inhibidor fisiológico IF1. **A**, Esquema representativo de la disposición de las subunidades en el complejo FoF_1 -ATPasa con IF1 unido y estructura cristalográfica de F_1 -ATPasa unido al péptido inhibidor de IF1 bovino truncado I1-60 (estructura generada con PyMol a partir de (Bason et al., 2014) (PDB = 4TSF)). Se muestran las subunidades β (rojo), α (amarillo), γ (azul) e IF1 (azul claro). **B**, Estructura cristalográfica del péptido de IF1 bovino I1-60 en su forma de dímero activo (azul claro y morado) generada mediante PyMol a partir de (Cabezón et al., 2001) (PDB = 1GMJ).

1.3. IF1, el inhibidor fisiológico de la H^{+} -ATP sintasa.

1.3.1. Isoformas y homología.

El factor inhibidor de la ATP sintasa 1 (IF1) es una pequeña proteína con sub-localización mitocondrial codificada nuclearmente por el gen *ATPIF1*, que en *Homo sapiens* está situado en el cromosoma 1 en la posición 28.435.198-28.437.198. Se ha descrito la existencia de 3 isoformas de la proteína fruto del fenómeno del splicing alternativo (Blencowe, 2006), de manera que el gen genera tres mRNAs distintos que varían en su longitud y secuencia. Así, la isoforma 1 que corresponde al IF1 de mayor longitud está formado por 3 exones y un corto 3'UTR (12.24 kDa, pI 9.34). La isoforma 2 contiene también 3 exones pero el último de ellos varía debido a un sitio de corte alternativo en la región 3' codificante provocando un cambio en el marco de lectura comparado con la variante 1 y generando una isoforma 2 con un extremo C-terminal más corto y además distinto (7.91 kDa, pI 7.96). Por último la isoforma 3 solo contiene los 2 primeros exones comunes a las otras variantes y un segmento alternativo que constituye su 3'UTR de gran longitud

(6.59 kDa, pI 8.34). Estas 3 proteínas de 106, 71 y 60 aminoácidos en su forma recién traducida son en realidad más cortas debido a que según las predicciones la pre-secuencia de localización mitocondrial (que suele escindirse en el proceso de importe) está formada por los 25 aminoácidos N-terminales. Esto ha sido confirmado por métodos de marcaje quimiosselectivo de extremos N-terminales y detección de IF1 (Xu et al., 2009).

La primera vez que se describió la proteína IF1 fue en los años 60 por Pullman y Monroy y fue en músculo cardíaco de corazón bovino (Pullman and Monroy, 1963). Después de esto se confirmó su presencia en otros mamíferos como rata (Cintrón and Pedersen, 1979; Rouslin and Pullman, 1987) así como en *C. elegans* (Ichikawa et al., 2006) o incluso en mitocondrias de plantas (Norling et al., 1990) aunque no así en cloroplastos. En levaduras se ha descrito una proteína muy similar en homología e incluso purificado con efectos inhibidores sobre la ATP sintasa (Hashimoto et al., 1981). En *Saccharomyces cerevisiae* parecen haber tres proteínas implicadas en la inhibición del complejo: Inh1, Stf1 y Stf2 aunque solo Inh1 y Stf1 se unen a la porción F_1 y Stf2 podría ser una proteína accesoria para la unión de alguna de los otros inhibidores (Hashimoto et al., 1990). Hay que destacar que el inhibidor de levadura, a pesar de su no muy alta homología con el IF1 de mamíferos, posee actividad inhibitoria cruzada sobre la βF_1 -ATPasa de éstos (Cabezón et al., 2002; Hashimoto et al., 1984).

1.3.2. Estructura de IF1 e interacción con la sintasa.

La forma activa de IF1 es un homodímero donde las regiones C-terminales de la proteína, que adopta extensamente una forma en α -hélice, generan unas hélices enrolladas antiparalelas (antiparallel coiled coil) (Cabezón et al., 2000a) pudiendo así unirse a dos F_1 -ATPasas. La región N-terminal supone la parte inhibidora de la proteína. Las estructuras cristalográficas obtenidas del complejo F_1 inhibido por una forma truncada del IF1 bovino (I1-60His) han dado mucha información acerca de los residuos importantes para la interacción así como de los cambios en la estructura que se producen en el proceso (Bason et al., 2014; Cabezón et al., 2003; Cabezón et al., 2001). IF1 se une a un complejo sitio de unión en la interfaz catalítica entre las subunidades α_{DP} y β_{DP} ocupando un espacio profundo alineado con las α -hélices que se encuentran en los extremos C-terminal de estas subunidades (ver Fig. 3). En esta conformación el extremo N-terminal de I1-60 interacciona con la región en forma de hélice súper-enrollada de la subunidad γ , extendiéndose el péptido en la cavidad acuosa de la F_1 -ATPasa (Cabezón et al., 2003; Gledhill et al., 2007). Para la unión específica e inhibición de la rotación de la ATP sintasa se requieren interacciones iniciales del inhibidor con el interfaz de las subunidades $\alpha_E\beta_E$, la conformación más abierta de las 3 en el enzima. Progresivamente, y tras la hidrólisis de dos moléculas de ATP, estas subunidades pasan a la

conformación más cerrada mediante dos giros de 120° de la subunidad γ pasando este interfaz ahora a ser un $\alpha_{DP}\beta_{DP}$. Estos giros y recolocación en la estructura de la ATP sintasa permiten que IF1 en su forma trunca bovina I1-60 pase de tener una estructura en el N-terminal intrínsecamente desordenada salvo una α -hélice C-terminal (Gordon-Smith et al., 2001) a generar más interacciones con las subunidades del complejo y plegarse de una manera muy específica de manera que ahora es el extremo N-terminal el que se presenta en forma de hélice mientras que el C-terminal que supone el dominio de homodimerización se encuentra desordenado (Bason et al., 2014) (Fig. 3). Todo este proceso se ve favorecido energéticamente por un aumento en la entalpía derivado de la formación de interacciones de IF1 y otros residuos de la F_1 -ATPasa y un aumento en la entropía por el enterramiento de residuos hidrofóbicos de IF1. Un estudio exhaustivo de mutaciones puntuales en los residuos conservados durante la evolución para esta forma bovina I1-60 (Bason et al., 2011) indica la importancia de algunos residuos para las interacciones hidrofóbicas entre la larga α -hélice de IF1 y los dominios C-terminales de las subunidades β_{DP} y β_{TP} , así como un importante puente salino entre el residuo Glu30 en el inhibidor y el residuo Arg408 de la subunidad β_{DP} (Ichikawa et al., 2005), que sostienen la unión en el estado inhibido. Otros residuos no se encuentran en contacto directo en la forma inhibida de la F_1 -ATPasa pero es necesaria su conservación para la correcta energía de unión entre el inhibidor y el enzima por lo que probablemente se implican en los pasos iniciales de la interacción (Bason et al., 2011). En resumen, la interacción entre el complejo F_1 -ATPasa y su inhibidor IF1 en su forma I1-60 está descrita cristalográficamente e implica la interacción del inhibidor con 5 subunidades del complejo y con progresivos e importantes cambios de conformación tanto en el complejo de la ATP sintasa como en IF1.

1.3.3. Oligomerización de IF1 y de la H^+ -ATP sintasa.

Se ha descrito que IF1 es una proteína básica con una capacidad de inhibición favorecida en condiciones de pH ácido. De hecho su capacidad de inhibición óptima es a pH 5.8-7 y disminuye progresivamente por encima de la neutralidad (Cabezón et al., 2000b; Panchenko and Vinogradov, 1985; Pullman and Monroy, 1963; Sah et al., 1993). Esta distinta inhibición dependiente del pH se debe a que, en teoría, IF1 a pH ácido dimeriza por sus extremos C-terminales con otra molécula de IF1, dejando libres los extremos inhibidores N-terminales. Sin embargo, el aumento de pH provoca que sea una proteína más pegajosa y que se formen tetrámeros por interacción entre un par de dímeros pero esta vez entre sus regiones N-terminales por lo que se inhabilita la capacidad inhibitoria de IF1 sobre la ATP sintasa (Cabezón et al., 2000b; Cabezón et al., 2001; Gordon-Smith et al., 2001). En esta regulación por pH son de vital importancia los 5 residuos histidina conservados de la secuencia de IF1 (48, 49, 55, 56 y 70) que poseen un pKa estimado cercano al rango de regulación por pH de IF1, dando un papel potencial a la protonación o desprotonación de

estos residuos para el cambio de estructura de IF1 y su posterior interacción. La mutación de cada una de las histidinas 48, 49, 55 o 56 o de todas ellas en el péptido inhibitorio mínimo descrito por el grupo de S. Papa resulta en una pérdida de actividad y de capacidad de ser regulada por pH (Papa et al., 1996). Estudios más completos se centran en la histidina H49 en IF1 bovino donde su mutación dirigida provoca que el inhibidor siga activo incluso a $\text{pH} > 6.7$ (Cabezón et al., 2000b; Schnizer et al., 1996). El mutante H49K ha sido estudiado con detalle y se ha visto por estudios de cross-linking que son los residuos 44-84 los que forman el dímero mientras que en el tetrámero interaccionan los fragmentos de residuos 32-84, y que el residuo H49 está implicado en la reorganización de IF1 por cambios en la estructura proteica (Cabezón et al., 2000b). Aunque su importancia es evidente parece ser que no se trata del único factor implicado en la regulación de la actividad inhibidora de IF1 por pH (Ando and Ichikawa, 2008).

Sabiendo que la forma activa de IF1 es un dímero con las dos zonas N-terminales que interaccionan con la F_1 -ATPasa libres a ambos lados de la estructura, y sabiendo que 1 mol de IF1 interacciona con 1 mol de ATP sintasa (estequiometría 1:1) (Hashimoto et al., 1981; Hekman et al., 1991; Klein et al., 1981; Klein et al., 1980) es probable por lo tanto que, tratándose de dímeros activos, se pase a una estequiometría 2:2 (Cabezón et al., 2000a). Esta regulación potencial significaría la formación de dímeros de H^+ -ATP sintasa y se ha descrito un efecto en este parámetro en algunos estudios. Así, existen evidencias de dimerización relacionada con IF1 obtenidas por cromatografía, ultracentrifugación analítica y microscopía electrónica (Cabezón et al., 2000a), así como por electroforesis en condiciones nativas (Campanella et al., 2008; Garcia et al., 2006) o cristalografía (Cabezón et al., 2003). Pero no todos los estudios indican la misma tendencia: en corazón bovino se ha descrito que IF1 se asocia tanto con los dímeros como con los monómeros de ATP sintasa y que los cambios en los niveles del inhibidor no se acompañan de distintos ratios monómero/dímero (Tomasetig et al., 2002), y en células HeLa con knock-down permanente de IF1 no se observan cambios en la ultraestructura mitocondrial ni en la formación de dímeros de ATP sintasa (Fujikawa et al., 2012). Otros estudios indican que, aunque su función no sea enteramente vital para la formación de dímeros, sí que puede ser parte de la estructura en forma de puente que se ha observado que une las dos partes F_1 del dímero de ATP sintasa (Minauro-Sanmiguel et al., 2005), dándole un papel estabilizador al complejo. Queda aún en el aire la cuestión de si la dimerización del complejo ATP sintasa produce una modulación clara en algún sentido de sus actividades ATP hidrolasa o ATP sintasa ya que hasta ahora hay trabajos favorables a una mayor actividad (Campanella et al., 2008; Strauss et al., 2008) como a no variación de la misma por dimerización debida a IF1 (Wittig and Schagger, 2009).

1.3.4. Efecto de IF1 en la actividad sintética de la H⁺-ATP sintasa.

La función fisiológica de IF1 sugerida para células bajo condiciones hipóxicas es el de inhibir la actividad hidrolasa de la H⁺-ATP sintasa, es decir el funcionamiento reverso que adopta el complejo cuando el pH de la matriz mitocondrial se desploma por debajo de la neutralidad. Su unión y acoplamiento al complejo enzimático es acompañado de dos hidrólisis de ATP sucesivas que producen un giro de 120° cada una en el brazo rotor que forma la subunidad γ (Bason et al., 2014) generando la conformación más cerrada del inhibidor sobre el complejo. Aunque se ha sugerido que el funcionamiento de la ATP sintasa en el sentido de la síntesis de ATP produciría los cambios conformacionales contrarios y la separación del inhibidor de la H⁺-ATP sintasa (Walker, 2013) y algunos estudios apoyan este hecho (Gomez-Puyou et al., 1979; Harris et al., 1979) no existe evidencia de que ese proceso ocurra simplemente ante la presencia de un gradiente electroquímico de protones. De hecho, estudios llevados a cabo en vesículas sub-mitocondriales indican que no solo la presencia de potencial de membrana es suficiente sino que se requiere la ausencia de moléculas de ATP para que IF1 se disocie del complejo inhibido (Lippe et al., 1988) indicando que posiblemente la unión del nucleótido a la H⁺-ATP sintasa impida los cambios de conformación necesarios para la separación de IF1. Asimismo, también la presencia de iones Mg²⁺ es necesaria para la correcta inhibición de IF1 (Klein et al., 1981). Además, aunque IF1 y en concreto el péptido inhibidor IF1(42-58) produce una gran inhibición de la translocación de protones en el sentido de la hidrólisis de ATP, también se produce este efecto aunque sea en menor medida en el sentido de la síntesis de ATP (Zanotti et al., 2009). Estudios similares pero en corazón bovino demuestran que la energización de estas partículas sub-mitocondriales producen una liberación de IF1 que a su vez genera un aumento conjunto de tanto la actividad ATP hidrolítica como sintética del complejo ATP sintasa (Lippe et al., 1988). Otros experimentos seminales en partículas submitocondriales con o sin IF1 y medida directa de la producción de ATP demostraron que la presencia del inhibidor en un tampón con glucosa y malonato producía una disminución clara de los niveles de ATP sintetizado, diferencia que desaparecía si se añadía el desacoplante FCCP a la reacción (Husain and Harris, 1983). Además, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) que poseen un defecto en la proteína IEX-1 (homólogo en ratón de la proteína humana IER3 cuya eliminación produce una acumulación de IF1) presentan una alta dependencia de glucólisis y menor de la OXPHOS (Shen et al., 2009). El efecto de IF1 en la actividad sintética del complejo V ha sido confirmado por nuestro grupo en modelos celulares de cáncer (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Cenizo et al., 2010), células madre (Sanchez-Arago et al., 2013b) y también en un modelo animal de sobreexpresión de la forma activa H49K de IF1 en neuronas (Formentini et al., 2014).

1.3.5. Funciones de IF1.

La función clásica de inhibición de la actividad ATP hidrolítica de la H^+ -ATP sintasa tiene como objetivo final la conservación de los niveles de ATP. Cuando el potencial de membrana disminuye se induce la reversión del funcionamiento del enzima, hidrolizando ATP para restaurar el gradiente de H^+ a través de la membrana interna mitocondrial (Hatefi, 1985). El efecto negativo de la ATP sintasa se extiende por su acoplamiento con la reversión de la dirección de funcionamiento del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Metelkin et al., 2006), un complejo transmembrana de la MIM que en condiciones fisiológicas media el intercambio de ADP citosólico y ATP mitocondrial, y cuyo funcionamiento reverso junto al del complejo V convierte a las mitocondrias de productores de ATP a consumidores del nucleótido. La inhibición mediada por IF1 de esta actividad hidrolítica impediría la depleción de ATP y tiene un efecto especialmente importante en la situación hipóxica o de baja tensión de O_2 como se ha demostrado en modelos de sobre expresión y silenciamiento de IF1 en condiciones hipóxicas (Campanella et al., 2008). La hipoxia *in vivo* es consecuencia de situaciones de isquemia y en estas condiciones se ha estudiado de manera amplia el papel de IF1 llegando a relacionar que la susceptibilidad a isquemia cardiaca entre distintas especies depende de los niveles y afinidad de unión de IF1 (Rouslin and Broge, 1992, 1996; Rouslin et al., 1995). Dado que los daños asociados a isquemia se relacionan con la depleción de los niveles de ATP, IF1 tiene aquí una función de retraso del daño y de la posterior muerte celular (Rouslin et al., 1990).

La hidrólisis de ATP por parte de la H^+ -ATP sintasa tiene como objetivo mantener el gradiente electroquímico de H^+ , por lo que la inhibición de la actividad ATP hidrolasa del complejo V no solo tiene efectos en el mantenimiento de los niveles de ATP sino que también puede verse reflejado en estas condiciones en un efecto en el potencial de membrana. Así, de nuevo en condiciones de hipoxia, células sobreexpresando IF1 mantenían mucho peor el potencial de membrana que células con IF1 silenciado, que además lo mantenían mejor que las células control (Campanella et al., 2008). El peor mantenimiento del potencial de membrana en situaciones de mal funcionamiento de la CTE hizo que en un screening genético de disfunción mitocondrial por inhibición con antimicina A la pérdida de IF1 resultará un factor de recuperación de la viabilidad celular por la recuperación del potencial de membrana perdido con el tratamiento químico (Chen et al., 2014). Esto le confiere a la disminución de IF1 un potencial terapéutico en situaciones patológicas relacionadas con disfunciones en la cadena respiratoria. También relacionado con su efecto sobre el potencial de membrana está el proceso de mitofagia en mitocondria, que afecta solamente a aquéllas que se encuentran en situaciones de despolarización. En un screening genético utilizando el desacoplante CCCP como desencadenante de despolarización mitocondrial se vio la

necesidad de la participación de IF1 (Lefebvre et al., 2013), ya que su eliminación conlleva un mayor mantenimiento del potencial de membrana y esto dificulta la estabilización de PINK1 en mitocondria, el reclutamiento de Parkin y el desencadenamiento de todo el proceso. Otra implicación que parece derivarse de su efecto sobre el potencial de membrana y por lo tanto del pH de la matriz mitocondrial es en la síntesis del grupo hemo por regulación de la actividad del enzima ferroquelatasa que cataliza la inserción de Fe^{2+} en el anillo de protoporfirina IX: el defecto en IF1 produce una elevación del pH mitocondrial, menor actividad del enzima y por lo tanto un fenotipo anémico en distintos modelos de vertebrados (Shah et al., 2012).

En referencia a la actividad ATP sintética, aunque algunos estudios indican que el silenciamiento de IF1 en células de osteosarcoma podría incluso disminuir la respiración en respuesta a ADP (Barbato et al., 2015), en nuestro grupo hemos centrado el estudio de IF1 en cáncer y su papel en la inhibición de la producción de ATP por fosforilación oxidativa. Hemos visto que la sobreexpresión de IF1 inhibe la fosforilación oxidativa y que esto se ve acompañado de un aumento en el flujo glucolítico (Formentini et al., 2014; Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Arago et al., 2013b; Sanchez-Cenizo et al., 2010) y que el silenciamiento de la proteína produce el correspondiente efecto contrario de menor actividad glucolítica y una mayor capacidad OXPHOS (Formentini et al., 2012; Sanchez-Cenizo et al., 2010). Todo esto desemboca en un fenotipo pro-tumoral de glucolisis aeróbica y mayor capacidad de invasión medida por ensayos de migración (Formentini et al., 2012). En relación a esta inhibición de OXPHOS y de la función mitocondrial se relaciona la producción de moléculas señalizadoras como son los ROS: la sobreexpresión de IF1 produce una señal de anión superóxido mitocondrial (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a) que genera una señal retrograda de supervivencia al núcleo que implica a la ruta de señalización NF κ B (Formentini et al., 2012). Esta señal de supervivencia activa un programa celular de mayor proliferación y una importante resistencia a la muerte celular. En células de colon (Formentini et al., 2012) y de ovario, pulmón y mama (Sanchez-Arago et al., 2013a) la sobreexpresión de IF1 produjo una resistencia elevada a muerte apoptótica inducida por estaurosporina comparado con las células control y todo ello dependiendo de la producción de ROS mitocondriales y de la activación de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL. Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de IF1 en células HeLa retrasa la liberación de citocromo C de la mitocondria y previene la muerte celular por apoptosis (Faccenda et al., 2013), e incluso nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo animal en el que se previene *in vivo* la muerte apoptótica neuronal inducida por ácido quinolínico gracias a la activación de vías de pre-condicionamiento metabólico y protección neuronal como son p70S6K, c-Fos y el eje Bcl-xL/NF κ B (Formentini et al., 2014).

Esta función de IF1 como regulador del equilibrio energético y como activador de moléculas y vías de señalización también ha supuesto que IF1 se relacione con el proceso de diferenciación celular. En un modelo de diferenciación osteogénica la desaparición de IF1 es progresiva con la diferenciación y con el cambio a un metabolismo más dependiente de OXPHOS, y el silenciamiento de la proteína en células madre mesenquimales acelera el proceso de diferenciación (Sanchez-Arago et al., 2013b). El proceso contrario de paso de MEFs a células madre pluripotentes inducidas (iPS) en ratón también implica un cambio y en este caso una acumulación clara de los niveles de IF1 como parte del proceso de reprogramación metabólica con un fenotipo mayoritariamente glucolítico (Vazquez-Martin et al., 2013). Por último, un estudio indica que IF1 podría estar acumulándose en los dímeros de ATP sintasa en el proceso de diferenciación de células cardíacas, pero son resultados controvertidos ya que la mayor unión de la proteína no conlleva cambios en ninguna de las actividades de la H⁺-ATP sintasa (Bisetto et al., 2013).

Al respecto de la funcionalidad fisiológica de IF1 en células eucariotas que no se encuentren en diferenciación, hipoxia o bajo un comportamiento tumoral, recientemente el grupo de Yoshida ha generado un ratón transgénico pobremente documentado donde la expresión de IF1 ha sido totalmente erradicada (Nakamura et al., 2013). En condiciones basales o de ayuno los ratones IF1-KO presentaron fenotipos iguales al control en cuanto a su cría, ultraestructura mitocondrial, autofagia o nivel de metabolitos o síntesis de ATP, por lo que es necesario hacer más estudios que confirmen las funciones de la proteína en éstas y otras condiciones.

1.3.6. Regulación de IF1.

A pesar de la importancia creciente de IF1 en la fisiología y patología, la regulación de sus niveles o de su actividad más allá de la regulación por pH es escasa. Así, en nuestro grupo se observó la acumulación significativa de la proteína en muestras tumorales humanas de pacientes de carcinomas prevalentes como son colon, pulmón, ovario y mama (Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Cenizo et al., 2010) lo que indicaba su potencial oncogénico (Formentini et al., 2012).

A nivel transcripcional se ha sugerido que la hipoxia y en concreto el aumento de los niveles de la subunidad α de HIF-1 (HIF-1 α) conlleva un aumento correspondiente de los niveles de mRNA de IF1 y de sus niveles proteicos tanto en hígado séptico de rata como en un modelo *in vitro* aumentando los niveles de HIF-1 α por tratamiento con CoCl₂ (Huang et al., 2011).

En un modelo de interferencia de la expresión de la RBP LRPPRC de manera específica en corazón de ratón se observó una deficiencia en el ensamblaje de la ATP sintasa acompañada de una clara acumulación de los niveles de IF1, todo ello en ausencia de cambios en los niveles de mRNA (Mourier et al., 2014), lo que implica a la proteína de unión a mRNA como un regulador directo o indirecto de la traducción o estabilidad proteica de IF1. En cuanto a la estabilidad de IF1 y su degradación, Shen y cols (Shen et al., 2009) han descrito que la proteína humana IER3 (o su homólogo en ratón IEX-1) interacciona directamente con IF1 por el extremo C-terminal de ésta y que la interacción afecta a la estabilidad por un supuesto envío a degradación por una vía de proteasas independiente del proteasoma. Esta degradación es dependiente de la presencia de ATP ya que incubación con carboxiatractilósido, un inhibidor del intercambiador mitocondrial ANT, revierte el efecto sobre los niveles de IF1 (Shen et al., 2009).

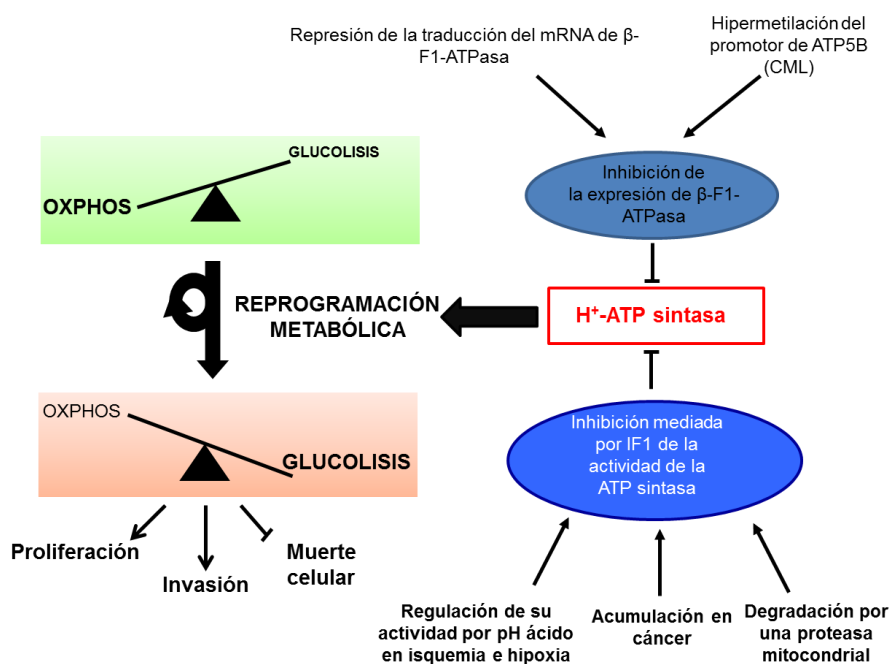


Figura 4. Mecanismos de inhibición de la H⁺-ATP sintasa. El diagrama incluye los mecanismos de control de la ATP sintasa a nivel de su expresión y actividad así como el efecto pro-tumoral que tiene la falta de su presencia o actividad. Se incluyen el control transcripcional por hipermetilación del promotor de su subunidad catalítica βF1, la represión de este mismo mRNA por RBPs o miRNAs así como la inhibición mediante la expresión activa de su inhibidor fisiológico IF1. IF1 se acumula en cáncer, se degrada de manera intramitocondrial y se regula positivamente por pH ácido.

Se ha descrito que la calmodulina (CaM) tiene capacidad de unirse a IF1, regulando así su actividad inhibitoria sobre la H⁺-ATP sintasa (Contessi et al., 2005; Pagnozzi et al., 2010; Pedersen and Hullihen, 1984). Al parecer, el dominio C-terminal de la CaM interacciona de forma calcio-dependiente y a pH ácido en una estequiometría 1:1 con la región N-terminal de IF1, favoreciendo

la disociación de los dímeros (Contessi et al., 2005; Pagnozzi et al., 2010; Pedersen and Hullihen, 1984). Puesto que la CaM se encuentra exclusivamente en el citosol se ha propuesto que el complejo IF1-CaM podría regular el importe de IF1 a la mitocondria (Contessi et al., 2007; Contessi et al., 2005).

Se han descrito análisis fosfoproteómicos masivos que indican que IF1 puede encontrarse fosforilado en sus serinas 39 (S14 según nomenclatura sin el péptido de localización mitocondrial) en músculo esquelético (Zhao et al., 2011) y líneas celulares tumorales (Sharma et al., 2014; Zhou et al., 2013) así como en su S63 (S38) (Christensen et al., 2010; Zhou et al., 2013). De la misma manera, en un ensayo de doble-híbrido se identificó IF1 como un potencial interactor de la proteína quinasa 1 inducida por suero y glucocorticoides (Sgk1), con posteriores ensayos confirmando la interacción y la fosforilación de IF1 aunque todo ello utilizando proteínas sintetizadas *in vitro* (O'Keeffe et al., 2013).

Otras modificaciones post-traduccionales reportadas en IF1 aunque sin ningún estudio de potencial funcionalidad para ellas son la acetilación y la succinilación. La acetilación de varios residuos entre los que destacan los residuos de IF1 humano lisina 82 y el muy conservado lisina 83 (K82, K83) han sido descritos por distintos estudios masivos del acetiloma mitocondrial e incluso se ha visto que el nivel de acetilación depende directamente a la presencia de la deacetilasa SIRT3 (Rardin et al., 2013b; Sol et al., 2012). Por su parte, la succinilación de varios residuos de IF1 ha sido descrita en células HeLa (Lundby et al., 2012) y parece que la sirtuina SIRT5 está implicada en su desuccinilación (Park et al., 2013).

2. OBJETIVOS

La H^+ -ATP sintasa es un complejo enzimático mitocondrial con un papel esencial en la producción de ATP y en la ejecución de la muerte celular. La desregulación a nivel de su expresión, actividad y ensamblaje se relacionan con distintas patologías humanas, incluyendo el cáncer. Uno de los mecanismos que regulan su actividad implica a su inhibidor fisiológico IF1, acumulado en gran cantidad en distintos carcinomas humanos prevalentes y recientemente descrito como inhibidor de tanto la actividad ATP hidrolítica como ATP sintética de la H^+ -ATP sintasa. Dada la escasez de estudios al respecto de la regulación de IF1 y a su potencial terapéutico en cáncer y en situaciones de malfuncionamiento de la CTE, el objetivo principal de esta tesis es ahondar en los mecanismos que gobiernan la diferente expresión de IF1 y que pueden implicarse en la acumulación observada en cáncer. Asimismo, también pretendemos conocer cuáles pueden ser los mecanismos reguladores de su actividad que expliquen el alto grado de expresión en tejidos con alta demanda energética y su función fisiológica en situaciones basales que no impliquen cáncer y fallo en la CTE.

En base a estas premisas nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudio de los mecanismos que regulan la **expresión** de IF1.
2. Estudio de los mecanismos que regulan la **actividad** de IF1.
3. **Relevancia fisiológica** de la regulación de la actividad de IF1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material.

3.1.1.Muestras humanas.

Todas las muestras humanas utilizadas en este trabajo han sido recibidas codificadas con objeto de preservar la confidencialidad de los pacientes. Los estudios que se han realizado han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid, del IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Augusto Pi y Suñer) y del Hospital Universitario de La Paz. Las muestras humanas normales y tumorales utilizadas en western blot y Phos-Tag electroforesis se adquirieron en secciones de 20 µm de espesor de biopsias congeladas (-80°C) del Banco de Tejidos y Tumores del IDIBAPS-Hospital Clinic de Barcelona. Las secciones de tejido normal y tumoral de cada paciente fueron previamente analizadas por un patólogo. Para más información, consultar (Isidoro et al., 2004). Las muestras humanas normales y tumorales de cDNA utilizadas en el análisis por PCR cuantitativa de los niveles del mRNA de IF1 proceden del array de cDNA TissueScan Tissue qPCR Arrays (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE.UU) para cada uno de los tejidos: mama (BCRT101), ovario (HORT102), colon (HCRT103) y pulmón (HLRT104). Para el análisis por RT-qPCR de los niveles de mRNA de cada isoforma de IF1 y de microRNAs específicos se extrajo el RNA de muestras humanas normales y tumorales pareadas obtenidas del Banco de Tejidos y Tumores IDIBAPS-HCB.

3.1.2.Líneas celulares.

HCT116 (ATCC CCL-247) Línea celular humana de cáncer de colon.

BT549 (ATCC HTB-122) Línea celular humana de cáncer ductal de mama.

Hs578T (ATCC HTB-126) Línea celular humana de cáncer de mama.

HeLa (ATCC CCL-2) Línea celular humana de cáncer de cuello de utero.

MCF-12F (ATCC 10783) Línea celular humana de mama no tumoral.

OVCAR8 (ATCC HTB-161) Línea celular humana de adenocarcinoma de ovario.

HOP62. Línea celular humana de carcinoma de pulmón.

A549 (ATCC CCL-185) Línea celular humana de carcinoma de pulmón.

SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) Línea celular humana de neuroblastoma.

SH-SY5Y sh-YME1L. Línea celular humana de neuroblastoma con un vector lentiviral que silencia la proteasa mitocondrial YME1L. Cedida por el laboratorio del Dr. R. Luke Wiseman (Scripps, La Jolla, CA, EE.UU).

3.1.3.Ratones.

Se utilizó la línea salvaje FVB (001800, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE.UU.) para el análisis del estado de fosforilación de IF1 y de las actividades enzimáticas de la ATP sintasa en corazón de ratón así como para los ensayos de degradación en mitocondria aislada de cerebro.

3.1.4.Cepas bacterianas.

Para la clonación, mantenimiento y amplificación de plásmidos se han empleado las cepas bacterianas DH5 α . El cultivo de esta cepa se efectuó en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) bactotriptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con Ampicilina o Kanamicina (100 μ g/ml), dependiendo de la resistencia del plásmido que portan.

3.1.5.Plásmidos.

Los plásmidos que se han usado en este trabajo son:

- Plásmido LightSwitch Luciferase Assay System GoClone ATP1F1 (S703914) (SwitchGear Genomics, California, EE.UU).
- Plásmido pMirTarget 3'UTR Clone ATP1F1 (SC201296) (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE.UU).
- Plásmido PCMV-Sport6-IF1, generado previamente en el laboratorio (Sanchez-Cenizo et al., 2010).

3.1.6.Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos purificados por HPLC y liofilizados se compraron a Invitrogen, (Carlsbad, CA, EE.UU.). Para generar una disolución de almacenamiento el liofilizado se resuspendió a 4°C con el volumen suficiente de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 2 mM) para obtener una concentración final del oligonucleótido de 100 μ M y se conservó a -20°C. La disolución de trabajo es 1/10 de la anterior en H₂O estéril. En la Tabla 1 se proporciona una lista de los oligonucleótidos que se han usado en este trabajo incluyendo la utilidad que se les ha dado.

Oligonucleótido	Sentido	Secuencia (5'-3')	Uso
F-IF1t	SS	GGGCCTTCGGAAAGAGAG	PCR cuantitativa
R-IF1t	AS	TTCAAAGCTGCCAGTTGTTC	PCR cuantitativa
F-IF1.1	SS	GAACGATATTTCCGAGCACAGAG	PCR cuantitativa
R-IF1.1	AS	CCTTCTTATGATGAACGATTCTTCTTC	PCR cuantitativa
F-IF1.2	SS	GAACGATATTTCCGACATTACAGGT	PCR cuantitativa
R-IF1.2	AS	TGGCTCAGGGTTTAATTCAATC	PCR cuantitativa
F-IF1.3	SS	GCGGGTCTCCAAAACAAC	PCR cuantitativa
R-IF1.3	AS	CACGCGGGAGATGGTAAT	PCR cuantitativa
F-βactina	SS	CCAACCGCGAGAAGATGA	PCR cuantitativa
R-βactina	AS	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	PCR cuantitativa
F-βfl	SS	CTTCAATGGGTCCCACCATA	PCR cuantitativa
R-βfl	AS	CAGCAGATTTTGGCAGGTG	PCR cuantitativa
F-YME1L	SS	CATGGTGGCAGGTGCTTAT	PCR cuantitativa
R-YME1L	AS	CTCCATCTCCCAGGCTCA	PCR cuantitativa
F-PMPCB	SS	TGCCAGCTTGCTGTTTAATG	PCR cuantitativa
R-PMPCB	AS	TTGCCTCTTTTATGGAAATGG	PCR cuantitativa
F-SPG7	SS	GTCCGGCTTCTCCAACAC	PCR cuantitativa
R-SPG7	AS	AGGGTAGCTGGTCAAGAGAGG	PCR cuantitativa
F-GAPDH	SS	AGCCACATCGCTCAGACAC	PCR cuantitativa
R-GAPDH	AS	GCCCAATACGACCAAATCC	PCR cuantitativa
F-COXI	SS	AGCTCTAAGCCTCCTTATTCGAG	PCR cuantitativa
R-COXI	AS	CGTTGTAGATGTGGTCGTTACC	PCR cuantitativa
F-S27A	SS	CCCGAGGCTTCGGCgCGGATCAGTCCGAG	Mutagénesis dirigida
R-27A	AS	CTCGGACTGATCCGcGCCGAAGCCTCGGG	Mutagénesis dirigida
F-S27E	SS	CCCGAGGCTTCGGCgaGGATCAGTCCGAG	Mutagénesis dirigida
R-S27E	AS	CTCGGACTGATCCtcGCCGAAGCCTCGGG	Mutagénesis dirigida
F-S39A	SS	CCGGGGCGCGGGCgCCATCCGGGAAGCC	Mutagénesis dirigida
R-S39A	AS	GGCTTCCCGGATGGcGCCCCGCGCCCCGG	Mutagénesis dirigida
F-S39E	SS	CCGGGGCGCGGGCgagATCCGGGAAGCCG	Mutagénesis dirigida
R-S39E	AS	CGGCTTCCCGGATctcGCCCCGCGCCCCGG	Mutagénesis dirigida
F-S63A	SS	GATATTTCCGAGCACAGgcTAGAGAACAACCTG	Mutagénesis dirigida
R-S63A	AS	CAGTTGTTCTCTAgcCTGTGCTCGGAAATATC	Mutagénesis dirigida
F-S63E	SS	GATATTTCCGAGCACAGgagAGAGAACAACCTGG	Mutagénesis dirigida
R-S63E	AS	CAGTTGTTCTCTctcCTGTGCTCGGAAATATCG	Mutagénesis dirigida
F-miR24BSMut	SS	TATTTGTCTGTgtgctactAACAGATTATA	Mutagénesis dirigida
R-miR24BSMut	AS	TATAATCTGTTtagtagcacACAGACAAATA	Mutagénesis dirigida

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados. Nombre: incluye un nombre resumido del amplicón y la orientación con respecto al molde. Sentido: respecto al molde (SS, igual orientación; AS, orientación contraria). Secuencia: la secuencia en dirección 5' a 3', en los oligonucleótidos de mutagénesis dirigida se incluyen los cambios nucleotídicos respecto a la secuencia original en minúscula. Uso: aplicación en la que se ha utilizado, PCR cuantitativa o mutagénesis dirigida.

3.1.7. Anticuerpos.

En la Tabla 2 se proporciona una lista de los anticuerpos que se han usado en este trabajo incluyendo su origen y la utilidad que se les ha dado.

Antígeno	Peso molecular	Origen	Productor	Utilidad/Dilución
IF1	12 kDa	Ratón	(Sanchez-Cenizo et al., 2010)	WB (1:250)/IP (1:25)
IF1	12 kDa	Ratón	Molecular Probes	WB (1:250)
β F1-ATPasa	52 kDa	Conejo	(Cuezva et al., 2002)	WB (1:40000)/IP (1:25)
β -actina	42 kDa	Ratón	Sigma	WB (1:10000)
IER3	17 kDa	Conejo	Sigma	WB (1:200)
HIF1- α	132 kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
Hsp60	60 kDa	Ratón	(Acebo et al., 2009)	WB (1:5000)/ IP (1:50)
F1-ATPasa	Varios	Conejo	(Valcarce et al., 1988)	IP (1:50)
CLPP	30 kDa	Conejo	Abcam	WB (1:200)
LONP1	107 kDa	Conejo	Abcam	WB (1:250)
HTRA2	49 kDa	Conejo	Cell Signaling	WB (1:500)
YME1L	85 kDa	Conejo	Abcam	WB (1:250)
GAPDH	36 kDa	Ratón	(Acebo et al., 2009)	WB (1:20000)/IP (1:50)
LRPPRC	130 kDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:1000)/IP (1:50)
Ubiquitina	-	Conejo		WB (1:1000)
Phospho-Ser	-	Ratón	Sigma	WB (1:500)
Phospho-Ser (PKA substrate)	-	Conejo	Cell Signaling	WB (1:250)
Phospho-Tyr	-	-	Santa Cruz	WB (1:500)

Tabla 2. Anticuerpos utilizados. En la tabla se indica la proteína que reconoce el anticuerpo, el peso molecular aparente que presenta en SDS-PAGE, el origen del anticuerpo, la compañía que lo desarrolló o la referencia del laboratorio donde se generó y se describe por primera vez, así como la utilidad que se le ha dado en la tesis y la dilución empleada. WB, western blot; IP, inmunoprecipitación.

3.1.8. Radioisótopos.

Las moléculas marcadas con radioisótopos se compraron a Perkin Elmer (Boston, EE.UU.), se conservaron a 4°C y se usaron durante el periodo de vida media correspondiente. Los que se han usado en este trabajo son el EXPRE³⁵S Protein Labeling Mix, [³⁵S]-, EasyTag™, el L-Amino Acid Mixture, [¹⁴C(U)] y el [γ -³²P]-ATP.

3.1.9. Inhibidores y compuestos.

Oligomicina (OL), antimicina A (Ant A), rotenona (Rot), dinitrofenol (DNP), cloruro de cobalto (CoCl₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), (4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluorido hidroclorehídrico (AEBSF), antimicina A, H89 dihidroclórico hidratado, dibutiril-AMPcíclico (db-cAMP), forskolina, fragmento inhibidor de proteína quinasa 6-22 (PKI), 2-deoxyglucosa, afidicolina, nocodazol, clenbuterol y propranolol hidrocloreuro suministrados por Sigma. MitoQ suministrado por el Dr. Murphy (MRC, Campus Biomédico de Cambridge, Reino Unido). MG132 y o-fenantrolina suministrados por Calbiochem (Merck KGaA Darmstadt, Alemania).

3.1.10. siRNAs y miRNAs.

Los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) utilizados en este estudio han sido un siRNA contra IF1 (QIAGEN S100908075) y un siRNA ineficiente como control negativo de silenciamiento (siCRL #1, Ambion). Obtenidos en la casa comercial Ambion/Applied Biosystems: siIER3, siCLPP, siLONP1, siHTRA2, siPMPCB, siYME1L, siSPG7. Pre-hsa-miR-CN, pre-hsa-miR-24-3p, pre-hsa-miR-183-5p, pre-hsa-miR-455-5p.

3.2. Métodos.

3.2.1. Biología molecular.

3.2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos

La preparación del DNA plasmídico para clonaciones, secuenciación o transfección se realizaron utilizando los kits Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EE.UU.) o Plasmid MAXI Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

3.2.1.2. Transformación de células *E. coli* competentes.

Células *E. coli* competentes (100 μ l) se incubaron con 50 ng de plásmido puro y 5 μ l de β -mercaptoetanol. A la mezcla se le aplicó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se volvió

a incubar en hielo durante 2 min. Las células se resuspendieron en 950 µl de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación. Después de esta incubación, se plaquearon 100 µl del cultivo bacteriano en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.2.1.3. Purificación de proteínas recombinantes.

Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con los tags 6xHis y estreptavidina en el extremo C-terminal de IF1 y GAPDH a partir de un cultivo bacteriano transformado con el plásmido *pQE-Trisystem* (QUIAGEN, Hilden, Alemania) correspondiente añadiendo IPTG 1 mM (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo en crecimiento. Se dejó expresar toda la noche, se recogieron las bacterias y se resuspendieron en Solución A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM, NaCl 300 mM, pH 8) suplementado con lisozima 1 mg/ml. Finalmente, se centrifugaron las bacterias y se purificaron las proteínas recombinantes IF1 y GAPDH a partir del precipitado sonificado usando la resina Ni-NTA (QUIAGEN) y eluyendo con imidazol. La pureza de las proteínas recombinantes fue evaluada por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Para la purificación de His-MBP-CP contenida en el plásmido pMAL-C se resuspenden las bacterias como en el paso anterior y el extracto crudo se pasa por la resina Ni-NTA previamente equilibrada en medio A y eluyendo también con imidazol pero pasando la proteína a un tampón RLN ($\text{NaHPO}_4\text{-Na}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, MgCl_2 1.5 mM, DTT 1 mM).

3.2.1.4. RT-PCR.

Para la producción de cDNA a partir de RNA se usó el kit de transcripción inversa de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.). En esta reacción se usó como molde 1 µg de RNA puro y no degradado en un volumen de reacción de 20 µl que contiene: 2 µl de tampón RT 10X, 0.8 µl de la mezcla de dNTPs (100 mM), 2 µl de hexámeros con secuencias al azar 10X, 1 µl de inhibidor de RNAasa (20 U/µl) y 1 µl de la transcriptasa en reverso (50 U/µl). Como control siempre se realizó una reacción poniendo 1 µl de agua en lugar de la transcriptasa en reverso (RT-). Se realizó el siguiente protocolo: anillamiento y extensión (10 min, 25°C), transcripción reversa (120 min, 37°C) y desnaturalización (5 min, 85°C). En el caso de los microRNAs, el contenido en miRNAs de extractos celulares y de tejido de ratón fue retrotranscrito utilizando el kit miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Universal cDNA Synthesis kit (Exiqon, Copenhagen, Dinamarca). En esta reacción se usó como molde 10 ng de RNA puro y no degradado en un volumen de reacción de 10 µl que contiene: 2 µl de 5x tampón de reacción y 1 µl del mix con la enzima además de la

muestra de RNA. El protocolo de PCR fue el siguiente: anillamiento y transcripción reversa (60 min, 42°C) y desnaturalización del enzima (5 min, 95°C).

3.2.1.5. PCR cuantitativa (qPCR).

Las amplificaciones a tiempo real en placa se llevaron a cabo en el ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las reacciones de PCR en tiempo real con la sonda SYBR Green Fast de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.) se realizaron a partir de 20 ng de cDNA en un volumen final de 10 µl conteniendo la SYBR Master mix 1X complementada con 0.25 µM de cada oligonucleótido. El protocolo consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (20 seg 95°C) para activar la enzima, 40 ciclos de amplificación (1 seg, 95°C de desnaturalización; 20 seg, 60°C de anillamiento y de extensión y adquisición de fluorescencia) y un paso final de 15 seg 95°C, 15 seg 60°C y 15 seg 95°C.

3.2.1.6. Mutagénesis dirigida de sitios de unión de miRNAs y de mutantes de IF1.

La mutagénesis dirigida del 3'UTR del plásmido pMIRTarget 3'UTR ATP1F1 para generar la mutación en el sitio de unión del hsa-miR-24-3p y la de la secuencia de IF1 del plásmido pCMV-SPORT6-IF1 para las construcciones de los fosfomutantes S27A, S39A y S63A así como los fosfomiméticos S27E, S39E y S63E se llevó a cabo usando el kit QuikChange Lightning (Agilent Technologies, Santa Clara California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizando los primers específicamente diseñados para el proceso (Tabla 1) se hizo la siguiente reacción de PCR con el plásmido molde y en presencia de dNTPs: 1 ciclo a 95°C durante 30 s, y un segundo ciclo de 18 repeticiones tales que 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y 5 min a 68°C. El producto de amplificación fue tratado con 10 U del enzima de restricción DnpI durante 1 h en la que se digiere el DNA molde. El producto amplificado ya sin el molde fue transformado en bacterias supercompetentes XL1-Blue y analizado por secuenciación la correcta inserción de los cambios.

3.2.2. Métodos de Bioquímica.

3.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteína en muestras biológicas.

Las proteínas procedentes de células en cultivo se extrajeron a partir del sedimento celular resultante de la centrifugación tras despegar las células de la placa con tripsina-EDTA. Este sedimento fue resuspendido en 100 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 130 mM y Triton X-100 al 0.5%) por cada 4 millones de células. Los tubos se agitaron durante 10 segundos con un vórtex y se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min a 11000 x g y a 4°C.

Las proteínas procedentes de tejidos de ratón se extrajeron a partir del tejido pulverizado con 300 µl de tampón de extracción (Tris 50 mM pH 8, NaCl 1% (v/v), Triton X-100 1%, DTT 1 mM, SDS 0.1% (p/v), EDTA 0.4 mM pH 8, inhibidores de fosfatasas, cóctel de inhibidores de proteasas). Los extractos se sometieron a tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 30°C y se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 30 minutos.

Para la separación monodimensional de proteínas fosforiladas utilizando Phos-Tag acrilamida, células HCT116 o corazones de ratones fueron homogenizados en un medio de extracción compatible con la técnica (Tris 50 mM, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% y MgCl₂ 10 mM). Las muestras humanas tumorales ya lisadas fueron precipitadas con acetona en dos pasos consecutivos, y el pellet resultante resuspendido en ese mismo medio.

La cantidad de proteína total de los extractos de proteínas se determinó mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

3.2.2.2. Extracción de RNA y miRNA de muestras de células y tejidos.

Los pellets celulares o trozos de tejido de corazón de ratón fueron lisados con el tampón de lisis del kit RNeasy mini kit o del miRNeasy mini kit (QUIAGEN, Duesseldorf, Alemania) y la extracción de respectivamente mRNA y miRNAs llevada a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.2.3. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE).

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Sambrook and Russell, 2001). Los extractos proteicos se mezclaron con el tampón de carga de Laemmli y se hirvieron a 95°C durante 5 min antes de cargar el gel. La calibración de la movilidad de las proteínas en los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas teñidas de peso molecular conocido: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 y 12 kDa (Rainbow markers, GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.).

Para la electroforesis en dos dimensiones, 200 µg de proteína celular se diluyeron en 250 µl de tampón de rehidratación DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) conteniendo 0.5% del tampón IPG del rango de pH deseado (IPG tampón 3-10L, 6-11NL y 3-11NL, GE Healthcare) y se cargaron en tiras de 13-cm Immobiline DryStrips (GE Healthcare) de cada uno de los diferentes gradientes utilizando un Ettan IPGPhor3 (GE Healthcare). Las tiras IPG se rehidrataron y enfocaron a 20°C, empezando con una rehidratación pasiva de 4 h seguido de 12 h de rehidratación activa a 50 V. El enfoque empezó con 15 min a 250 V, 500 V durante 1 h y otra

hora a 1000 V, seguido por un aumento lineal hasta 10000 V durante 3 h para luego mantener estos 10000 V hasta que se alcanzaron los 60000 V-h. Después de este isoelectroenfoque, las tiras IPG enfocadas fueron equilibradas con 0.170 M de Tris-HCl pH 6.8 conteniendo urea 6 M, glicerol 20%, SDS 2% y DTT 130 mM durante 15 minutos, seguido del mismo tampón pero conteniendo iodoacetamida 135 mM con azul de bromofenol en lugar de DTT y con agitación constante a temperatura ambiente. Las tiras ya equilibradas fueron transferidas a la parte superior de un gel de poliacrilamida del 12% sin gel concentrador y la electroforesis de proteínas llevada a cabo utilizando un sistema Protean II XI (Bio-Rad) a corriente constante (30 mA/gel a 4°C durante 4 h).

3.2.2.4. Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida.

La detección de proteínas marcadas con emisores β de baja energía [^{35}S] y [^{14}C] se efectuó mediante fluorografía utilizando como fluoróforo el ión salicilato (Sambrook and Russell, 2001). Brevemente, el gel se incubó durante 30 min con medio de fijación (ácido acético 10%, isopropanol 25%) y se lavó posteriormente dos veces con agua destilada durante 15 min. A continuación, el gel se incubó durante 1h en salicilato sódico 1 M y se secó mediante vacío y calor. El gel seco se expuso a películas autorradiográficas a -70°C.

3.2.2.5. Ensayo quinasa *in vitro*.

Las proteínas recombinantes purificadas fueron incubadas (50 nM) en la presencia o ausencia de Protein Quinasa A de corazón bovino (7.5 nM; Sigma) durante 30 min a 30°C en 50 μl de tampón de reacción quinasa (Tris-HCl 25 mM, pH 7.4, MgCl_2 5 mM, DTT 0.5 mM, ATP 50 μM , NaF 4.5 mM, db-cAMP 6 μM , y 4800-12000 cpm/pmol de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP). El control positivo utilizado fue el sustrato conocido de PKA phosvitin (Sigma). La misma reacción se realizó también en proteína IF1 nativa inmunoprecipitada de un cultivo celular. Tras añadir tampón de ruptura e incubar las muestras a 95°C durante 5 min, las proteínas se resolvieron por electroforesis monodimensional. Para la detección de la señal de [^{32}P], los geles fueron fijados, tenidos en solución con azul de Coomassie y el gel seco fue expuesto de manera directa a películas autorradiográficas a -70°C.

3.2.2.6. Detección inmunológica de proteínas (*Western blot*).

Las proteínas fraccionadas en geles monodimensionales se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electro-transferencia húmeda. La transferencia se efectuó a 100V durante 45 min en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v)) utilizando un equipo Mini Trans Blot de Bio-Rad para los mini-geles y un Trans-Blot Cell de Bio-Rad para los geles de electroforesis bidimensional. A continuación las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche desnatada liofilizada al 5% p/v diluida en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150

mM) más 0.1% Tween-20) durante al menos 1h con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1h o durante toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS más albúmina bovina al 3% o al 5% según el anticuerpo y NaN_3 1 mM. Los anticuerpos usados en esta tesis y las diluciones están resumidos en la Tabla 2. A continuación, las membranas se lavaron 1 vez durante 10 min y 2 veces durante 5 min con TBS-Tween (0.1%). Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology, 1:5.000). Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el software Kodak Digital Science 1D.

3.2.2.7. Defosforilación de proteínas.

Para la defosforilación inespecífica de extractos proteicos se utilizó la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CiP) (New England Biolabs, Massachusetts, EE.UU). Se incubó 1 unidad de CiP por microgramo de proteína de extractos celulares o de corazón de ratón durante 1 h a 37°C tras lo que las muestras se procesaron.

3.2.2.8. Phosphate-affinity (Phos-Tag) electroforesis.

Para la detección en gel monodimensional de la fosforilación de IF1 se cargaron 30 μg de cada muestra en geles del 10% de poliacrilamida conteniendo 80 μM de Phos-Tag acrilamida (Wako Chemicals, Osaka, Japón) y MnCl_2 160 μM (Sigma) (Kinoshita et al., 2009). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 h a corriente constante de 25 mA/gel. Una vez terminada la electroforesis, los geles se sometieron a 2 lavados en tampón de transferencia con EDTA 10 mM y SDS 0.01% y un último lavado en tampón de transferencia con SDS 0.01%. La transferencia se llevó a cabo durante 45 min a 100 V y en presencia de EDTA 1 mM. Todas las proteínas presentan movilidad electroforética reducida en estos geles, y las formas fosforiladas de las proteínas aparecen como bandas con menor movilidad electroforética que las formas defosforiladas de la mismas.

3.2.2.9. Purificación e identificación de proteínas de unión al mRNA de β -F1-ATPasa.

Se utilizó la técnica puesta a punto en el laboratorio (Ortega et al., 2010). En primer lugar se saturó la resina de Ni^{2+} incubando un exceso molar de la proteína recombinante His-MBP-CP 8 h a 4°C en solución de unión que contiene tampón RLN suplementado con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA espermatozoide de

salmón e inhibidores de proteasas (Roche). Antes del experimento se incubó 1 nmol de His-MBP-CP inmovilizada en la resina con 0.1 nmol de β -F1-mRNA transcrito *in vitro* puro utilizando el sistema MEGascript T7 (Ambion) a partir del plásmido h β fl-MS2h. Después de 3 lavados se incubó con el extracto de proteínas de HCT116 (12 mg de proteína) 2 h a 4°C en agitación constante. La elución de las proteínas asociadas al mRNA se llevó a cabo por incubación con RNasa A 20 μ g/ml en tampón RLN durante 30 min a 37°C. Las proteínas eluidas se precipitaron por acetona e identificadas por espectrometría de masas RP-LC-MS/MS en un sistema Agilent 1100 acoplado a una trampa de iones lineal LTQ-Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.3. Biología celular

3.2.3.1. Cultivo de líneas celulares.

La línea celular HCT116 se cultivó en McCoy's 5A suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y aminoácidos no esenciales 400 μ M (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Las células BT549, Hs578T, A549 y HeLa se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con la suplementación anterior. La misma suplementación se añadió al medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) para cultivar las células HOP62 y OVCAR-8. Las células de neuroblastoma SH-SY5Y se mantuvieron en medio DMEM/F12 (50:50) suplementado como los anteriores. Las células no tumorales MCF-12F se crecieron y mantuvieron también en medio DMEM/F12 pero suplementado esta vez con suero de caballo 5%, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF), 0.01% mg/ml de insulina, 500 ng/ml de hidrocortisona y 100 mg/ml de toxina colérica. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C con 5% CO₂ y un 95% de humedad. Para la conservación de las líneas se congelaron de forma gradual (14h a -20°C y 24h a -70°C antes de ser conservadas en N₂ líquido) en alícuotas de 5 millones de células con no más de 3 pases acumulados en 1ml del medio de cultivo con DMSO al 5%. La descongelación de estos viales se realizó a 37°C diluyéndolas inmediatamente en medio de cultivo y centrifugándolas antes de ponerlas a crecer.

3.2.3.2. Tratamientos celulares.

Para su adaptación metabólica, las células se trataron con oligomicina 6 μ M o 2-deoxiglucosa 10 mM durante 48 h cambiando el tratamiento por uno nuevo a las 24 h del mismo. Las células han sido tratadas también con 200 μ M de CoCl₂ durante 4, 8 o 12 h o con 100 mM de H₂O₂ durante 4 y 8 h. Se hicieron los siguientes tratamientos cortos de 3 y 6 h para los distintos inhibidores de rutas de degradación: 40 μ M de MG132, 400 μ M de AEBSF y 100 μ M de o-fenantrolina. Para desactivar

o activar la acción de PKA se usaron respectivamente 10 μ M del inhibidor de PKA H89, 1 μ M del inhibidor PKI, o bien 100 μ M del activador db-cAMP o 40 μ M del agonista forskolina. En el arresto en distintas fases del ciclo celular se incubaron las células durante 48 h con 6 μ M afidilcolina o con 5 μ g/ml de nocodazol durante 24 h. Los tratamientos con antimicina A (50-100 μ M) y MitoQ (20 nM) se hicieron en tiempos de 6 y 12 h. Para el tratamiento de hipoxia, las células fueron expuestas a bajas concentraciones de oxígeno (1% O₂) durante los tiempos indicados en una cámara de hipoxia Hypoxic Workstation H35 (Don Whitley Scientific).

3.2.3.3. Transfección transitoria de plásmidos, siRNAs y miRNAs.

Para la transfección de plásmidos en células eucarióticas se utilizaron preparaciones de alto grado de pureza y filtrados (0.2 μ m, Millipore). En estos experimentos se utilizaron los reactivos Plus y Lipofectamina (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma rutinaria, se mantuvo el medio de cultivo con los complejos liposoma catiónico-DNA en contacto con las células durante dos horas, se cambió el medio y se analizó el fenotipo a 24 o 48 h post-transfección según el tipo de ensayo. En el caso de los siRNAs, éstos se transfectaron a una concentración final de 30 nM en el momento en que se plaquearon, utilizando el reactivo siPORT NeoFx (Ambion/Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso el medio se cambió 24 h post-transfección y se analizó el fenotipo 48 h post-transfección. Para los miRNAs se utilizó el mismo sistema y se analizó el fenotipo a 48 h post-transfección, eligiendo como concentración óptima final la de 60 nM.

3.2.3.4. Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo.

Células tratadas o no tratadas al 70 % de confluencia se incubaron 20 min en medio de cultivo sin metionina ni cisteína. Tras esta incubación se retiró este medio y se añadió el medio de marcaje (medio de cultivo sin metionina ni cisteína) y 0.65 mCi/ml de EXPRE³⁵S³⁵S Protein Labeling Mix, [³⁵S]-, EasyTagTM y se dejó incubando durante 1 h de pulso. El marcaje con 10 μ Ci/ml de [¹⁴C]-L-aAs se hizo durante 30 min para la determinación de la velocidad de síntesis de proteínas.

3.2.3.4.1. Velocidad de síntesis de proteínas in vivo.

Tras realizar un marcaje metabólico de corta duración de las proteínas, se lavaron inmediatamente las células con PBS frío, se tripsinizaron, se recogieron, se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 0.5 M, Tritón X-100 2%, desoxicolato sódico 1 %, SDS 0.2%) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche) y se congeló y descongeló tres veces en N₂ líquido para favorecer la lisis celular. Rutinariamente, se usó un pocillo de una placa p6 por cada punto. Se determinó la cantidad de proteína de los extractos y la incorporación de [³⁵S]-

metionina o de [^{14}C]-L-aAs. Para calcular la incorporación de aminoácidos marcados sobre el conjunto de proteína celular, cada muestra se precipitó con ácido tricloroacético y se contó la radiactividad presente exclusivamente en el precipitado de proteínas. Brevemente, a 2 μl de extracto se le añadieron 20 μl de SDS 0.5%, 50 μl de BSA 2 mg/ml y 2 ml de ácido tricloroacético al 15%, Met 1 mM y se dejaron precipitar las proteínas 1h en hielo. La mezcla se pasó a través de filtros GF/C que se lavaron con ácido tricloroacético al 5%, se secaron con etanol y se sumergieron en líquido de centelleo (Hi SafeII, GE Healthcare) antes de realizar el contaje. La cantidad de [^{35}S]-metionina incorporada se normalizó por los μg de proteína en cada muestra. Se fraccionaron 10 μg de proteína total marcada con los radioisótopos en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (9%) más 4 M de urea. Para analizar la cantidad de proteína sintetizada durante el periodo de marcaje se procedió a la inmunoprecipitación de la proteína de interés partiendo de unos 200 μg de proteína total.

3.2.3.4.2. Estudio del recambio de proteínas mediante pulso y caza.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento en cada condición experimental, para el pulso y caza se hizo un marcaje metabólico con [^{35}S]-metionina durante 1 h. Tras el marcaje, las células se lavaron tres veces con medio normal para quitar los restos de aminoácidos marcados y en este momento se recogieron las células a tiempo cero (t_0). Para los demás tiempos, las células se dejaron incubando en medio completo suplementado con metionina y cisteína 5 mM o con todo el conjunto de aminoácidos esenciales. En los tiempos indicados, se recogieron las células con tripsina y se inmunoprecipitaron las proteínas de interés partiendo de unos 200 μg de proteína total. Para calcular la vida media de las proteínas, se llevó a cabo la densitometría de las bandas y la media de cada tiempo se normalizó por la media del tiempo 0h donde la cantidad de proteína es máxima. Se representó en una recta el \ln de las bandas normalizadas frente al tiempo y la vida media se calculó mediante la fórmula:

$$t_{1/2}: 0.693/Kd$$

donde Kd , es la constante de degradación que se corresponde con la pendiente de la recta.

3.2.3.5. Inmunoprecipitación (IP).

En primer lugar se realizó el recubrimiento de la resina de proteína G sepharosa (Sigma) con el anticuerpo. Para ello, se incubaron 10 μl de resina por punto, previamente hinchada y equilibrada, con 12 μg de IgGs de los siguientes anticuerpos monoclonales producidos en nuestro laboratorio: anti- β -F1-ATPasa (Cuezva et al., 2002), anti-GAPDH (Acebo et al., 2009), anti-IF1 (Sanchez-Cenizo et al., 2010) y anti-Hsp60 (Acebo et al., 2009) en 1 ml de tampón RIPA suplementado con 5

mg de BSA durante toda la noche a 4°C. También se preparó resina incubada con IgGs de ratón no específicas como control de inmunoprecipitación. Posteriormente, se lavó la resina tres veces con RIPA. La resina con el anticuerpo inmovilizado se conservó a 4°C hasta 15 días en RIPA con NaN_3 0.02%. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo partiendo de 200 µg de proteína total de los extractos celulares diluidos en RIPA y se les añadió 10 µl de resina cubierta de anticuerpo hasta un volumen final de 300 µl y se les dejó incubar al menos 4 h a 4°C en la noria. Posteriormente, se lavó la resina 5 veces con 1 ml de RIPA sin apurar el precipitado y finalmente, una vez con PBS dejando seca la resina. La resina se eluyó con tampón Laemmly de electroforesis 10 min a 95°C, se centrifugó a 12.000xg y se analizó el material inmunoprecipitado mediante fraccionamiento en gel y subsiguiente fluorografía.

Para ensayos de co-inmunoprecipitación, el pellet celular fue lisado en un tampón específico (Tris-HCl 50 mM pH 6, NaCl 150 mM, Nonidet P40 0.5%, suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasas (Sigma) durante 1 hora con agitación constante. Se centrifugaron las muestras lisadas durante 15 minutos a 13000 r.p.m y de este lisado se utilizaron 400 µg de proteína para su incubación con 12 µg del correspondiente anticuerpo primario previamente unido a la resina EZ View Red Protein G Affinity Gel (Sigma) a 4°C. La resina se lavó 5 veces con el tampón frío antes de procesar con tampón Laemmly como en los ensayos de inmunoprecipitación. La co-inmunoprecipitación de dos o más proteínas se analizó fraccionando en gel y observando por western blot la presencia en el inmunoprecipitado.

3.2.3.6. Inmunoprecipitación de RNA (RIP).

Se recogieron células HCT116 y se lavó el pellet 2 veces con PBS. Las células fueron lisadas en tampón de lisis RLNT (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 140 mM, MgCl_2 1.5 mM, Triton X-100 0.5%) suplementado con inhibidores de proteasas y con inhibidor de RNAsas (Applied Biosystems) y el lisado preclareado por incubación con resina con proteína G durante 2 h a 4°C. Tras centrifugar la resina el sobrenadante fue incubado con proteína G asociada a 12 µg de una IgG inespecífica o de un anticuerpo contra la RBP LRPPRC (sc-66844) (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.). La resina se lavó 4 veces con tampón RLNT frío y otras 4 veces con tampón RLNT suplementado con urea 1 M. La elución se llevó a cabo en un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 140 mM, MgCl_2 1.5, Triton X-100 0.25%, SDS 0.1%) suplementado con 42 µl de proteinasa K (Roche) mediante incubación a 50°C durante 30 min. El paso de elución se repitió y se juntaron los dos eluidos para extraer el RNA utilizando TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y precipitado utilizando el carrier Glycoblue (Ambion). El RNA purificado se retrotranscribió y la expresión relativa de los mRNAs a analizar determinado por PCR cuantitativa.

3.2.3.7. Medida del flujo glucolítico.

La determinación del flujo glucolítico se realizó midiendo la velocidad inicial de producción de lactato mediante la determinación de la concentración de este metabolito presente en el medio de cultivo. El método se fundamenta en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD^+ con la consiguiente formación de NADH, cuya concentración se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340nm. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato. Se midió el flujo glucolítico en células tratadas o no tratadas, al 70% de confluencia en placas p6 con 2 ml de medio de cultivo fresco. A las 2h se tomaron alícuotas de 100 μl del medio. Las muestras recogidas se precipitaron con 4 volúmenes de ácido perclórico al 6% durante 45 min en hielo y, después de centrifugar 5 min a 11.000xg a 4°C, los sobrenadantes se neutralizaron en presencia de indicador universal y se usaron para la determinación enzimática del lactato (Cuezva et al., 1982). Se mezclaron en la cubeta de reacción 200 μl de agua, 500 μl de la mezcla de reacción (Glicina 1M, Hidracina- SO_4 0.4M, EDTA 1.3mM, NAD^+ 7.5 mM, pH=9.5) y en último lugar 300 μl de muestra y se realizó una prelectura a 340nm en el espectrofotómetro (E0). A continuación, se añadieron 10 μl de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 40 min (E1). Se calculó la concentración de lactato expresado como nmoles de lactato producido por μg de proteína y hora aplicando la ley de Lambert-Beer ($E1-E0=C \cdot l \cdot \epsilon$).

3.2.3.8. Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa.

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). Las medidas se realizaron en placas de 24 pocillos estériles especiales que contienen los dos biosensores fluorescentes (O_2 y pH) así como cuatro puertos diferentes por pocillo útiles para permitir la inyección secuencial de diferentes compuestos. Los biosensores del aparato se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una ganancia única del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de calibrado en una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocidos. Las células se sembraron a una densidad de 8-32.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl de medio. Dos horas después se añadieron 150 μl de medio para asegurar la correcta distribución de las células en el pocillo. Se realizaron los tratamientos correspondientes incubando siempre la placa a 37°C y 7% CO_2 . El día del experimento el medio se sustituyó por 700 μl de medio de cultivo. Las células se dejaron en una estufa a 37°C durante al menos 1h para equilibrar la temperatura y el pH. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron como fentomoles de oxígeno consumido por minuto y por

célula con la máquina añadiendo progresivamente en cada pocillo: OL 6 μM , Rot 1 μM , Ant A 1 μM y DNP 0.5 μM .

3.2.3.9. Citometría de flujo.

Una suspensión en PBS de células tripsinizadas se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución de FACS (FBS 1%, NaN_3 0,1 % y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10000 células. Los resultados se analizaron con el programa FloJo para Mac.

3.2.3.9.1. Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio.

Este método se basa en la tinción del DNA de células que han sido previamente fijadas con yoduro de propidio, compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de DNA emitiendo fluorescencia, de tal modo que la intensidad de la misma es proporcional a la cantidad de DNA de la célula y se puede medir por citometría de flujo. Esta tinción tiene una doble aplicación: por una parte permite analizar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, y por otra, el porcentaje de células apoptóticas (subG_0), ya que, como consecuencia de la fragmentación del DNA aparece un pico de células hipodiploide (Darzynkiewicz et al., 1992). Las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. También se recogió el medio de cultivo con el fin de no perder aquellas células que se habían despegado de la placa como consecuencia del proceso de apoptosis. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min y a 4°C. El sedimento celular se lavó con PBS y tras resuspender las células en PBS frío, se fijaron añadiendo la cantidad correspondiente de etanol absoluto (a -20°C) para dejarlo al 70%. La suspensión celular se mantuvo a -20°C al menos 12h. Para la tinción con yoduro de propidio se centrifugaron a 900 x g a 4°C durante 5 min. El sedimento celular se lavó 2 veces en PBS frío y las células se resuspendieron en 300 μl de tampón de ciclo (PBS, RNAsa A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y yoduro de propidio 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a temperatura ambiente y se incubaron 30 min a 37°C. Tras la incubación, se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de ser analizadas por citometría de flujo.

3.2.3.9.2. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno.

Posteriormente a los tratamientos celulares que se indican, para la medida de los radicales libres de oxígeno (ROS) mitocondriales, se marcaron las células con la sonda MitoSOX (Molecular Probes, Eugene, Oregon) diluida en PBS completo a una concentración de 5 μM durante 10 min a 37°C protegidas de la luz. La sonda MitoSOX es un nuevo indicador fluorescente que permite la

detección selectiva de radical superóxido en la mitocondria de células vivas. Esta sonda, una vez que entra dentro de la célula se dirige a la mitocondria de una forma rápida y selectiva. Una vez en la mitocondria, la sonda se oxida fácilmente por el superóxido pero no por otras especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS). El producto de oxidación se vuelve altamente fluorescente al unirse a ácidos nucleicos y puede ser detectado por citometría de flujo a una longitud de onda de 580 nm de emisión al ser excitado con una longitud de onda de 510 nm. Después de la incubación, se lavaron las células con PBS completo y se levantaron con tripsina. El sedimento celular, se resuspendió en tampón de FACS y se pasó por el citómetro.

3.2.3.10. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó el “Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit” (Chemicon Internacional). El método se basa en la detección y cuantificación de proteínas modificadas por radicales libres de oxígeno. Estas modificaciones tienen como consecuencia la introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas que se derivan a DNP-hidrazona por la reacción con DNPH. Las muestras de proteína derivadas a DNP se separan en geles de poliacrilamida seguido del protocolo habitual de *Western blot*. Para ello, el sedimento celular de las células sometidas a distintos tratamientos se lavó con PBS y se extrajo la proteína. A continuación, se llevó a cabo la derivatización de las proteínas celulares (20 µg) mediante la incubación con dinitrofenilalanina (DNPH) durante 30 min. Las muestras proteicas así derivadas se fraccionaron en geles al 12% y se procesaron mediante *Western blot*. Junto a las muestras derivadas se fraccionaron muestras control sin derivar. El anticuerpo primario utilizado fue anti-DNP a una dilución 1:500 y el secundario a una dilución 1:300 siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.3.11. Ensayo de la actividad promotora de ATPIF1.

Las células se transfectaron con un plásmido vacío como control negativo o con el plásmido LightSwitch Luciferase Assay System GoClone ATPIF1 que presenta la región que contiene el promotor del gen *ATPIF1* aguas arriba de la secuencia que codifica para la luciferasa RenSP. 24 h post-transfección y tras los estímulos a estudiar, se determinó la actividad luciferasa en placa usando el kit comercial “Luciferase Assay System” de Promega en el luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). La luz se produce mediante la conversión de la energía química de oxidación de la luciferina a través de una transición de electrones. Oxidación que cataliza la luciferasa utilizando ATP-Mg²⁺ como co-sustrato. Antes de cada medida se llevó a cabo una calibración para determinar el rango lineal de detección de luz.

3.2.3.12. Ensayo de eficiencia traduccional regulada por el 3'UTR de IF1.

Se co-transfectó cada uno de los microRNAs de interés junto al plásmido pMirTarget 3'UTR Clone ATP1F1 que contiene el 3'UTR de la isoforma 1 de IF1 a continuación de la secuencia que codifica para la luciferasa de luciérnaga y bajo el control de un promotor constitutivo. 24-48 h post-transfección se recogieron las células y se lisaron para pasar los lisados a una placa de 96 pocillos. Para normalizar la señal por eficiencia de transfección se midió en primer lugar la fluorescencia por proteína roja fluorescente (RFP) que también codifica el plásmido pMirTarget, y después por luminometría la eficiencia traduccional en cada una de las condiciones usando el kit comercial Luciferase Assay System en el luminómetro FLUOstar OPTIMA.

3.2.3.13. Aislamiento de mitocondrias de líneas celulares.

Se partió de al menos 10 millones de células previamente lavadas dos veces con PBS. La ruptura celular para la extracción de mitocondrias se realizó mediante choque hipotónico. Para ello el pellet se resuspendió en tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7.2), en una proporción aproximada tampón:pellet celular de 7:1 (volumen:volumen). La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo, permitiendo de este modo que las células se hincharan facilitando su ruptura mediante homogeneización, realizando entre 8 y 10 pases en el *potter* de vidrio con émbolo de teflón. Rápidamente, el homogenado se diluyó a la mitad con tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7.2) y, tras mezclar bien, se centrifugó a 1000 g (3000 rpm, en el rotor SS34) durante 5 minutos a 4° C, para eliminar los núcleos y las células que no se hubieran roto. Nos quedamos con el sobrenadante que contendrá extracto citosólico y mitocondrias. Este paso de centrifugación se repitió una vez más y el sobrenadante resultante se sometió a una centrifugación a alta velocidad (8000 x g) durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet de mitocondrias resultante se lavó en 1 ml de tampón B (sacarosa 250 mM, EGTA 0.3 mM, BSA 0.2 % p/v, Tris-HCl 1 mM pH 7.4) tras lo que se procedió a la medida de proteína de una fracción de la resuspensión y a la determinación de las actividades de la ATP sintasa en las mitocondrias aisladas.

3.2.3.14. Determinación de la actividad ATP hidrolasa de mitocondrias aisladas de células o tejidos de ratón.

La actividad ATP hidrolítica de la ATP-sintasa se midió espectrofotométricamente mediante un ensayo acoplado utilizando lactato deshidrogenasa (LDH) y la piruvato quinasa (PK) como enzima acoplante (Barrientos et al., 2009). El ADP generado en la hidrólisis de ATP permite a la PK transformar el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, el cual a su vez es utilizado por la LDH para generar lactato oxidando en el proceso una molécula de NADH a NAD⁺. Por cada molécula de ATP

que es hidrolizada, una molécula de NADH se oxida como consecuencia pudiéndose detectar por la disminución en la absorbancia a 340 nm. Esta disminución en la absorbancia con el tiempo se midió en placas de 96 pocillos con un FLUOstar OPTIMA en una suspensión de 30-50 µg de mitocondria aislada de células o de corazón de ratón tomando una medida cada 15 seg. El tampón de reacción es de 100 µl/reacción y contiene Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 5 mg/ml BSA, MgCl₂ 20 mM, KCl 50 mM, FCCP 15 µM, antimicina A 5 µM, PEP 10 mM, ATP 2.5 mM, 4 U de LDH y de PK, y NADH 1 mM. Cuando la reacción se estuvo produciendo durante al menos 3-5 min, se añadió OL 6 µM y a continuación se siguió midiendo comprobando que se producía una inhibición casi completa (> 90%) de la actividad ATP hidrolítica. La actividad ATPasa específica se expresó en nanomoles de NADH oxidado/min/miligramo de proteína mitocondrial, calculado según la ecuación de Lambert-Beer: $N = A_{340}/(\epsilon_{340} \times l)$, donde N es la concentración de NADH oxidado, A₃₄₀ el cambio en la absorbancia medida, ϵ_{340} el coeficiente de extinción molar, y l la longitud de paso de placa ($\epsilon_{340} = 6.22/\text{mM/cm}$).

3.2.3.15. Determinación de la actividad ATP sintasa de células permeabilizadas o de mitocondrias aisladas de células o tejidos de ratón.

El ensayo de medida de síntesis de ATP ante sustratos respiratorios se llevó a cabo en células permeabilizadas o bien en mitocondrias aisladas, ya sea de células o de tejido de ratón. Con el fin de permeabilizarlas, aproximadamente 3 millones de células HCT116 estuvieron durante 1 minuto con agitación en medio de respiración (sacarosa 225 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,05 % p/v, tampón fosfato-potasio 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) conteniendo digitonina 50 µg/ml de medio. Tras la permeabilización, las células fueron rápidamente centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 5 min y el pellet celular se lavó dos veces con medio de respiración atemperado para asegurarse de que no queda digitonina. A continuación, las células permeabilizadas (200 µg) o bien las mitocondrias (50 µg) aisladas de células o de corazón de ratón se resuspendieron en el medio de respiración suplementado con succinato 2 mM, rotenona 10 nM, el inhibidor de la adenilato quinasa P¹,P⁵-di(adenosina-5') pentafofato 150 µM y ADP 5 mM. Se tomaron alícuotas a los intervalos de tiempo indicados (tiempo 0 y cada 1 minuto hasta 4 minutos) y a 30°C. Las alícuotas se precipitaron inmediatamente con HClO₄ 6% durante 1 h a 4°C, centrifugado a 11000 r.p.m. durante 5 min y posteriormente el sobrenadante se neutralizó con KOH 10% en presencia de indicador universal. Después de esto, se determinó el contenido en ATP de una fracción utilizando el kit ATP Bioluminescence Assay Kit de Roche para determinar la velocidad inicial de síntesis de ATP. En paralelo se realizó el ensayo de cada una de las condiciones pero con presencia en el medio de oligomicina a concentración final de 30 µM.

3.2.4. Métodos en ratones

3.2.4.1. Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones.

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en el Animalario del CBMSO, en celdas estancas dotadas de ventilación y en un número apropiado al tamaño de la celda. Los animales dispusieron de libre acceso al agua y a una dieta estándar (23% proteínas, 5% lípidos, 40.8% glúcidos, 4% celulosa, 5.7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La temperatura y la humedad fueron controladas, oscilando entre los 22-24°C y el 40-50% respectivamente, así como los periodos de luz/oscuridad con ciclos de 12h/12h comenzando a las 08.00 am. La estabulación y manejo de los ratones fueron realizados por personal con la formación necesaria y siguiendo la normativa vigente y las directrices institucionales oportunas en cuanto a bienestar animal. Todos los experimentos fueron, además, aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. Los experimentos fueron realizados con un número de réplicas por condición que minimizase el uso de animales siempre que se garantizara la validez estadística del estudio. Los experimentos se llevaron a cabo, según se indica, en ratones de fondo genético FVB con una edad comprendida entre las 12 y las 20 semanas.

3.2.4.2. Modulación adrenérgica *in vivo*.

Para la activación y bloqueo de receptores β -adrenérgicos se utilizaron respectivamente clorhidrato de clenbuterol y propranolol, dos efectores adrenérgicos clásicos. 12 h antes del sacrificio del animal, se inyectó intraperitonealmente 1 mg/kg de peso de clenbuterol o 10 mg/kg de peso de propranolol. Como control de tratamiento, se inyectó un volumen semejante de PBS en otros ratones.

3.2.4.3. Extracción de órganos de ratón.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los órganos de interés se extrajeron inmediatamente después. Los órganos extraídos se lavaron en PBS y se procesaron según su uso posterior. Para la extracción de proteínas se pulverizaron en mortero con N₂ líquido y se homogeneizaron y trataron con el tampón correspondiente.

3.2.4.4. Aislamiento de mitocondrias de órganos de ratón.

Se sacrificó el animal, se extrajo el cerebro completo y se pesó. A continuación, se trituró, se añadieron tres volúmenes de medio A y se homogeneizó en *potter* de vidrio (5 pases con un émbolo y 5 pases con otro émbolo más ajustado). Se centrifugó 10 minutos a 1000 x g para desechar restos celulares, se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar 10 minutos a 9000 x g para precipitar

las mitocondrias. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de medio B. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo y las centrifugaciones a 4°C. La cuantificación de la cantidad de mitocondrias aisladas se realizó midiendo la cantidad de proteína presente en una alícuota de la suspensión de mitocondrias sometida a tres ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido para provocar la ruptura de la membrana mitocondrial.

Para la extracción de mitocondrias de corazón de ratón el protocolo que se siguió fue el siguiente siempre manteniendo la temperatura a 4°C. Se extrajo el corazón y se trituró en seco tras lo que se pasó al *potter* de vidrio añadiendo 1 ml de medio de homogenización (sacarosa 0.075 M, sorbitol 0.225 M, EGTA 1 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0.1% y Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). Se homogenizó el tejido triturado (15 pases con un émbolo y otros 15 con el otro émbolo más ajustado) y se centrifugó 5 min a 1000xg. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar de la misma manera 5 min a 1000xg. Una centrifugación final a 12000xg durante 10 min dio como resultado el pellet de mitocondria aislada, que ya fue resuspendido en medio de respiración para medir proteína y finalmente determinar las actividades de la ATP sintasa.

3.2.4.5. Ensayos de degradación en mitocondria aislada.

Se aislaron mitocondrias de células o de cerebro de ratón, tras lo que se resuspendieron en medio de degradación (sorbitol 250 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2.5 mM, y 20 mM HEPES pH 7.4). Añadido al medio malato 5 mM, piruvato 10 mM, y succinato 20 mM, se incubó a 37°C en presencia o ausencia de los compuestos disruptores de proteasas mitocondriales durante tiempos de 3 y 6 h. Tras los tiempos indicados las mitocondrias se centrifugaron a 9000 x g durante 15 min y se analizó el contenido de proteínas por western blot.

3.2.5. Métodos estadísticos

3.2.5.1. Estadística aplicada.

Se aplicó el estadístico de contraste de la t de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los resultados, considerándose estadísticamente significativo un $p < 0.05$. Para comparar las vidas medias de las proteínas en distintas condiciones, se analizó la correlación lineal entre las distintas pendientes.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE IF1.

4.1.1. Estructura génica y promotor de IF1.

El gen humano que codifica para IF1 se encuentra localizado en el cromosoma 1 entre las bases 28.562.602-28.564.616 con una longitud total de 2015 pares de bases (pb). Debido a la ausencia de estudios previos respecto a la determinación y análisis de la secuencia promotora del gen *ATPIF1*, el primer objetivo fue delimitar una secuencia génica en la que tuviéramos seguridad de que el promotor del gen estuviera incluido. Para ello se utilizó el repositorio genómico de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>) que engloba datos del proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) y otros proyectos descriptivos del genoma de *Homo sapiens* y otras especies cercanas (Fig. 5). Como ya hemos dicho antes IF1 posee 3 mRNAs distintos producidos por splicing alternativo que dan lugar a 3 isoformas que varían en la longitud de su 3'UTR así como en la longitud de la proteína codificada. Para la delimitación de la región promotora de cualquier gen existen parámetros genómicos característicos en los que centrarse: i) baja ocupación de nucleosomas, ii) presencia de islas CpG, iii) zona de cromatina abierta (medido por sensibilidad a DNasa I), iv) unión a determinados factores nucleares o v) conservación filogenética.

En el caso del gen *ATPIF1* tras el análisis de todos ellos, tres de esos parámetros resultaron muy informativos. Las islas CpG son pequeñas secuencias genómicas que se relacionan en mamíferos con sitios de iniciación de la transcripción y por lo tanto forman parte de un alto porcentaje de los promotores génicos ya anotados (Saxonov et al., 2006). El análisis de islas CpG para el área genómica que contiene el gen *ATPIF1* destacó una región enriquecida en CpG de 466 pb (Fig. 5A) (chr1:28.562.511-28.562.976) que engloba desde 91 pb antes del sitio +1 de inicio de transcripción del gen hasta 374 después del mismo, indicando la alta probabilidad de que el promotor génico se encuentre en esa región. Por otro lado, datos de experimentos de secuenciación tras inmunoprecipitación de cromatina (ChiP-seq) utilizando un anticuerpo específico para la RNA-polimerasa II en distintas líneas celulares humanas también indicó la misma región como sitio de unión de esta enzima clave en el proceso de transcripción (Fig. 5B). En último lugar, la conservación entre secuencias del gen para especies distintas también se relaciona con la importancia de dicha secuencia. En este sentido, el análisis de las secuencias PhastCons (Fig. 5C) de la región génica elegida muestra que hay una cobertura para casi todo el exón 2, partes del exón 1 y para el sitio +1 de transcripción, al igual que para partes del exón 3 y zonas concretas de la

región 3' UTR. Es de destacar la presencia de una pequeña región conservada que se encuentra más allá de la región 5' UTR y del inicio de transcripción, coincidente con la isla CpG y la región de unión a RNA-polimerasa II, apoyando de nuevo la probabilidad de que el promotor de IF1 se encuentre en esta región muy cercana (menos de 100 pb) del sitio de inicio de la transcripción. Un dato de interés es la presencia de otra secuencia altamente conservada en una región interna no codificante del gen, en concreto del intrón 2, que podría sugerir la existencia de una secuencia de control transcripcional interno.

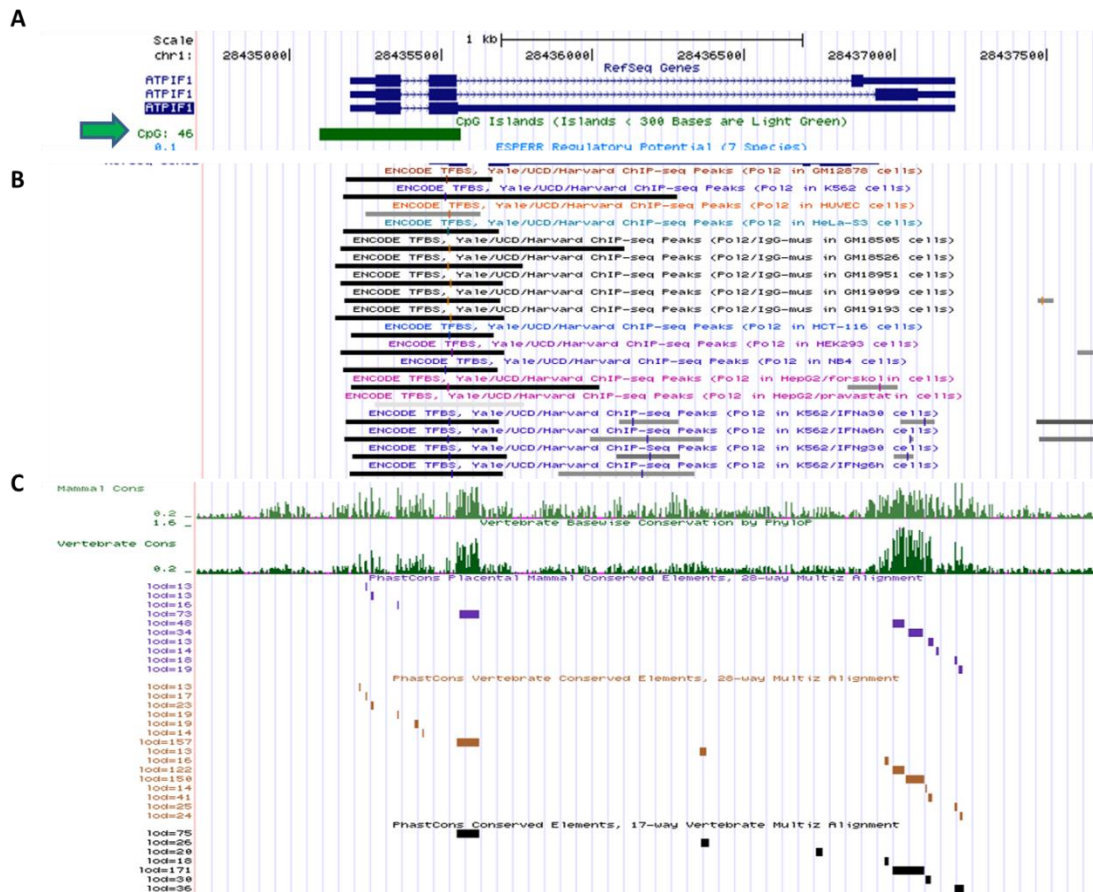


Figura 5. Datos compilados del UCSC Genome Browser en el área cromosómica que contiene el gen ATPIF1. A, Gen de IF1 con sus 3 isoformas y con presencia de una isla CpG (verde) en -91 pb del sitio de inicio de transcripción del gen y +374 pb después de éste. **B,** Regiones génicas enriquecidas en experimentos de ChIP-seq inmunoprecipitando RNA-polimerasa II en distintas líneas celulares eucariotas. **C,** Conservación génica en mamíferos y vertebrados por multi-alineamiento destacando las secuencias consideradas conservadas por el programa de conservación evolutiva PhastCons.

El siguiente paso fue hacer un estudio de los factores de transcripción que podrían estar regulando la transcripción del gen ATP1F1. Para ello, dicha secuencia genómica fue introducida en una base de datos pública de predicción de sitios de unión de un gran abanico de factores de transcripción (TRANSFAC database, <http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/databases/transfac/search.cgi>) (Fig. 6A). Además de este estudio *in silico* también se tuvieron en cuenta los datos de secuenciación masiva para los experimentos de ChIP-seq englobados en el proyecto ENCODE y para un abanico limitado de factores de transcripción eucariotas (Fig. 6B). Estos análisis revelaron la existencia de elementos potenciales de respuesta en cis- de factores de transcripción relacionados con el fenotipo tumoral: factores de transcripción implicados en la regulación del ciclo celular (NF-YB, NF-YA, Ini1, TAF1), proliferación (c-FOS, Sp1, c-MYC) o inflamación y muerte celular (NFκB). Consistente con la localización mitocondrial de IF1, su promotor también se une al factor NRF1, el cual se encarga de controlar la expresión de genes nucleares requeridos para la biogénesis y función de la mitocondria.

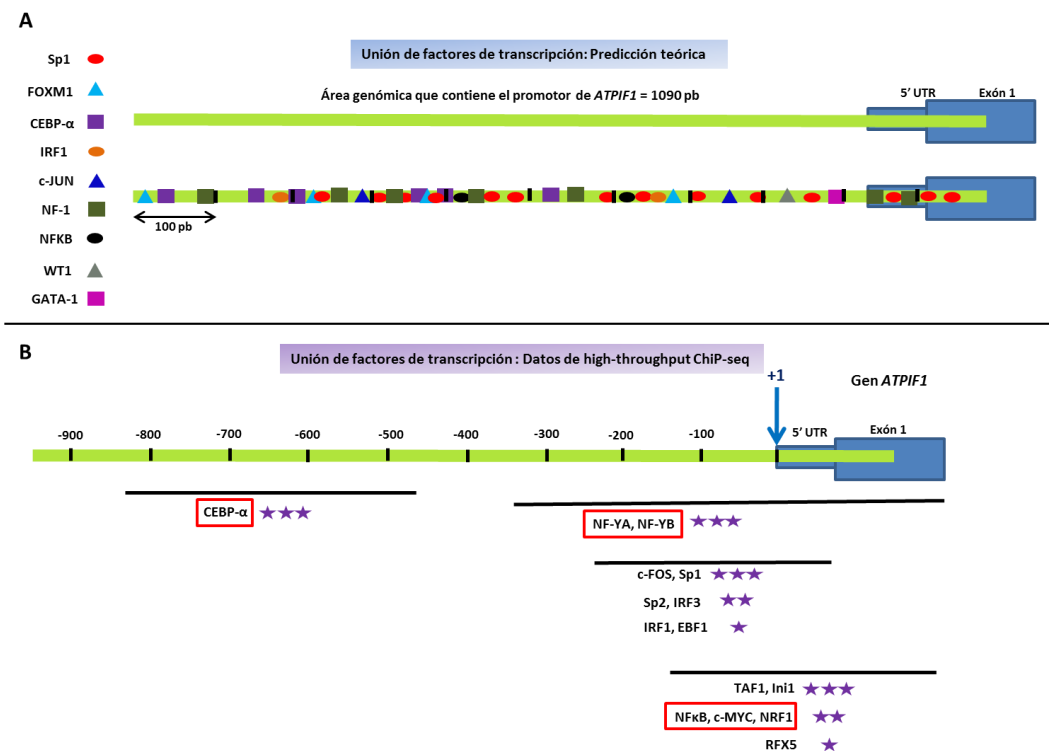


Figura 6. Potenciales factores de transcripción del promotor de ATP1F1. La región cromosómica que contiene el promotor del gen se estudió por: **A**, predicción teórica de unión de factores de transcripción (TRANSFAC database) y **B**, esquema de los sitios de unión y afinidad (1 a 3 estrellas = baja a alta) de los factores de transcripción que interaccionan con el promotor proximal del gen ATP1F1 sacado de los datos de ChIP-seq del proyecto ENCODE compilado en el UCSC Genome Browser.

4.1.2. Análisis de la expresión del mRNA de IF1 en cáncer.

Nuestro grupo ha descrito que la expresión de la proteína de IF1 está muy aumentada en los carcinomas humanos más prevalentes (Sanchez-Arago et al., 2013a) (Fig. 7A). Por este motivo, analizamos los niveles de mRNA de IF1 en tejido sano y tumoral de pacientes oncológicos. Utilizando un par de primers específicos que reconocen el cDNA de las 3 isoformas de mRNA de IF1. El estudio se realizó en tejidos de colon (HCRT101), pulmón (HLRT104), mama (BRCT101) y ovario (HORT102) por medio de qPCR (Fig. 7B). El análisis reveló que en la situación tumoral, a pesar de existir un gran aumento de IF1 a nivel de proteína como se observa por inmunohistoquímica (Fig. 7A), los niveles de mRNA se mantenían constantes (colon, pulmón y mama) o incluso disminuían (ovario) evidenciando la importancia de mecanismos de regulación post-transcripcional para la expresión de IF1 en cáncer (Fig. 7B).

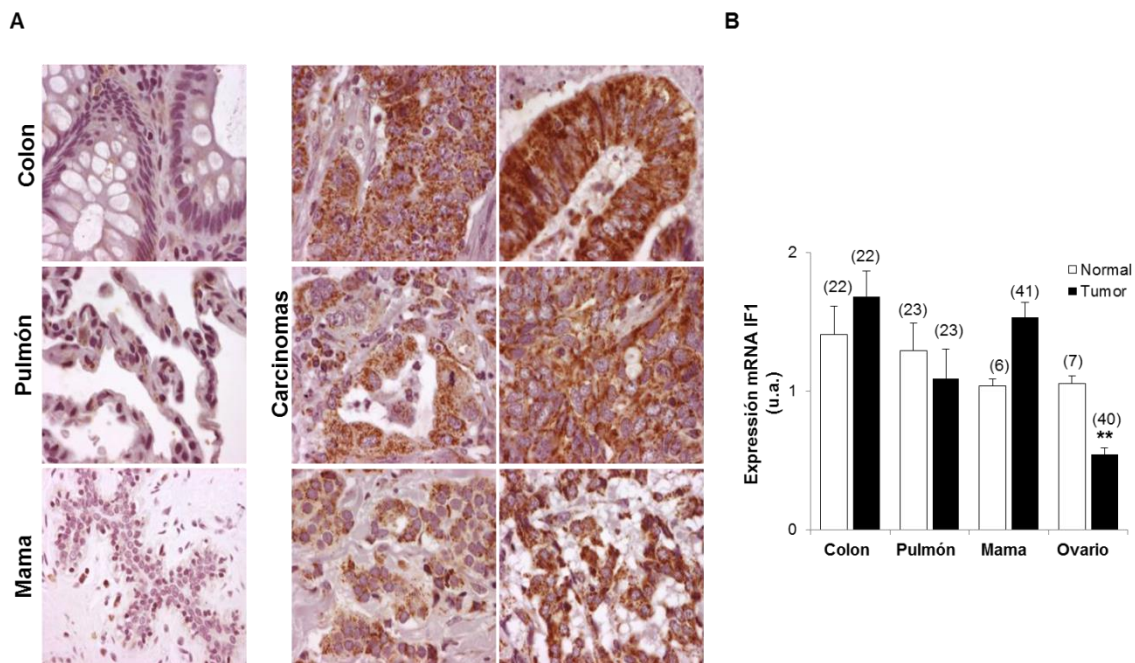


Figura 7. La sobreexpresión de IF1 en carcinomas humanos prevalentes no se debe a cambios en mRNA. **A**, Imágenes representativas de inmunohistoquímicas de muestras normales y tumorales de colon, pulmón y mama (Sanchez-Arago et al., 2013a). **B**, PCR cuantitativa de muestras normal y tumoral de cDNA de pacientes con carcinomas de colon, pulmón, mama y ovario. Los histogramas representan la expresión relativa del mRNA de IF1 relativo al de β -actina como la media \pm SEM del número de pacientes indicado encima de la barra. ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.1.3. Expresión mayoritaria de la isoforma 1 de IF1 en tejido normal y tumoral.

La existencia de diferentes isoformas de IF1 sugiere la posibilidad de una expresión tejida específica y/o de expresión diferencial de isoformas para la patología. Por ello, se diseñaron pares de primers específicos y excluyentes para cada una de las isoformas y se realizó análisis por RT-qPCR de muestras pareadas de tejido normal y tumoral de pacientes para colon, pulmón y mama. La determinación cuantitativa de los niveles de los distintos mRNAs (Fig. 8A) puso de manifiesto que existía una prevalencia muy acusada de expresión de la isoforma 1 (la más larga) con respecto a las otras dos.

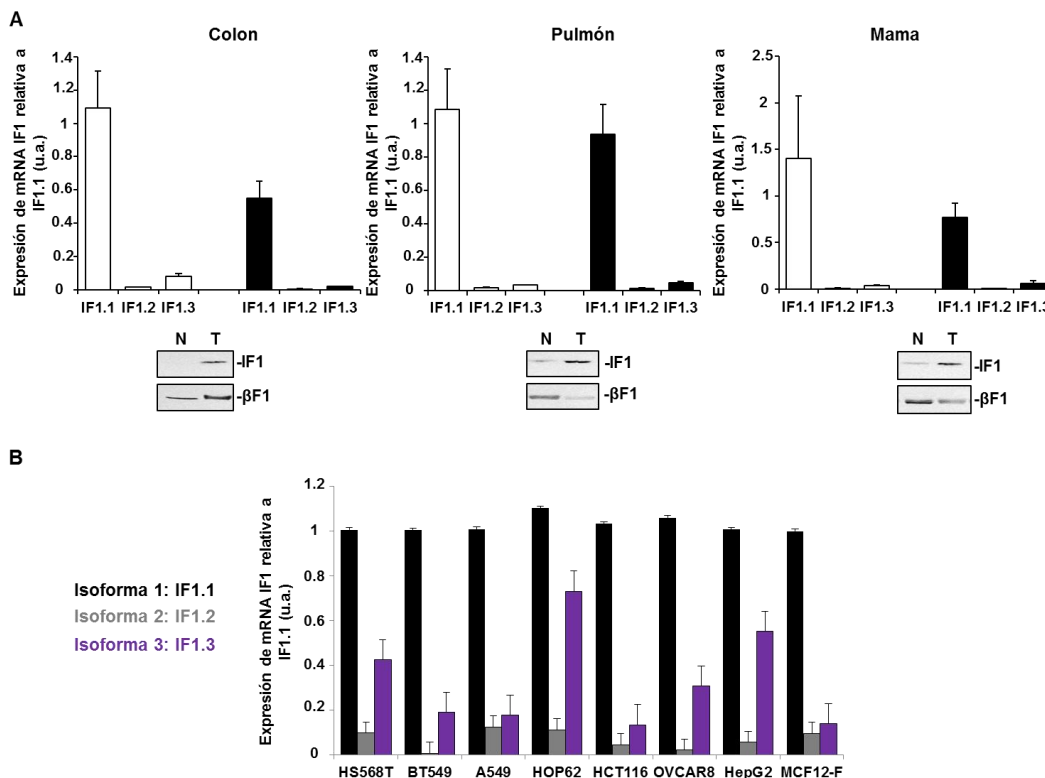


Figura 8. La isoforma 1 de IF1 es la mayoritaria en tejido normal y tumoral así como en líneas celulares. **A**, PCR cuantitativa de las 3 isoformas de IF1 en muestras humanas pareadas normales y tumorales de tejidos de colon, pulmón y mama. El análisis por western blot de las mismas muestras confirmó la acumulación de IF1 en las muestras de los 3 tipos de tumor así como la masa molecular que corresponde a isoforma 1. **B**, PCR cuantitativa para las 3 isoformas de IF1 en líneas celulares humanas tumorales y no tumorales de mama, pulmón, ovario, colon e hígado. Los histogramas representan la expresión relativa del mRNA de cada isoforma de IF1 relativo al de la isoforma 1 como la media \pm SEM de los tejidos normal y tumoral de 5 pacientes (**A**) o de 5 muestras distintas de cada línea celular (**B**).

Para confirmar el dato se realizó el mismo experimento pero con RNA extraído de distintas líneas celulares humanas tanto de origen tumoral como una línea no tumoral (MCF12-F) (Fig. 8B). El análisis confirmó que, en todas las líneas celulares estudiadas, la isoforma 1 era de nuevo la más expresada mientras que la isoforma 2 prácticamente tenía nula expresión y la isoforma 3 (la más

corta) estaba presente pero en mucha menor cantidad relativa comparada con la isoforma 1. Por otro lado, esos datos concuerdan con los de proteína ya que la isoforma 1 codifica la proteína IF1 más larga (12 KDa), que es la mayoritaria y prácticamente la única que se expresa tanto en tejidos normales como tumorales (Fig. 8A).

4.1.4. IER3 y la hipoxia no afectan la expresión de IF1.

Se ha descrito que IER3 es una proteína de estrés que afecta a los niveles de IF1 promoviendo un aumento de su degradación dependiente de una metaloproteasa (Shen et al., 2009). Con el fin de determinar si realmente existe una relación inversa entre los niveles de IF1 y los de IER3 se procedió a: i) analizar el contenido relativo de esta última en muestras humanas donde previamente habíamos observado una clara acumulación de IF1 en los carcinomas (Fig. 9A), y ii) silenciar parcialmente IER3 en HCT116 y observar si había variación de la expresión de IF1 (Fig. 9B). El análisis del contenido de IER3 reveló su muy baja expresión en muestras no tumorales de pacientes humanos mientras que las muestras tumorales pareadas de los mismos pacientes sí que presentaban una expresión significativamente más alta, siguiendo el mismo patrón de expresión que IF1, y no el inverso (Fig. 9A). Del mismo modo, el silenciamiento parcial de IER3 (~50%) tampoco afectó a los niveles estacionarios de IF1 tras 48 h de transfección (Fig. 9B) por lo que descartamos que en estos carcinomas IER3 juegue un papel para promover la acumulación de IF1.

Utilizando un plásmido que codifica el gen de la luciferasa con el promotor del gen *ATPIF1* (GoClone ATPIF1 S703914) se realizaron experimentos a tiempos cortos de estímulos de hipoxia (CoCl_2 , DMOG) o estrés oxidativo (H_2O_2) sobre la actividad promotora del gen, ya que ambos están relacionados con la función mitocondrial e incluso en el caso de la hipoxia se ha propuesto como mecanismo regulador de los niveles de IF1 (Huang et al., 2011). Midiendo la señal de luminiscencia tras tiempos cortos (4 y 8 h; Fig. 9C) de tratamiento con estos compuestos, se pudo ver que ni el DMOG ni el H_2O_2 tenían efecto sobre la actividad luciferasa y por lo tanto sobre la actividad transcripcional de IF1. Por el contrario, el CoCl_2 presentaba un claro aumento de la actividad promotora del gen (Fig. 9C). Para verificar el posible efecto de la hipoxia sobre la expresión de IF1 se procedió a hacer tratamientos de 6 h con CoCl_2 a células HCT116, tras lo que se analizó por Western blot la expresión del factor HIF-1 α e IF1 (Fig. 9D). Los resultados mostraron la inducción de HIF-1 α por CoCl_2 y la ausencia de cambios en la expresión de IF1 (Fig. 9D) lo que cuestiona en parte el papel de la hipoxia en la regulación de la expresión de IF1.

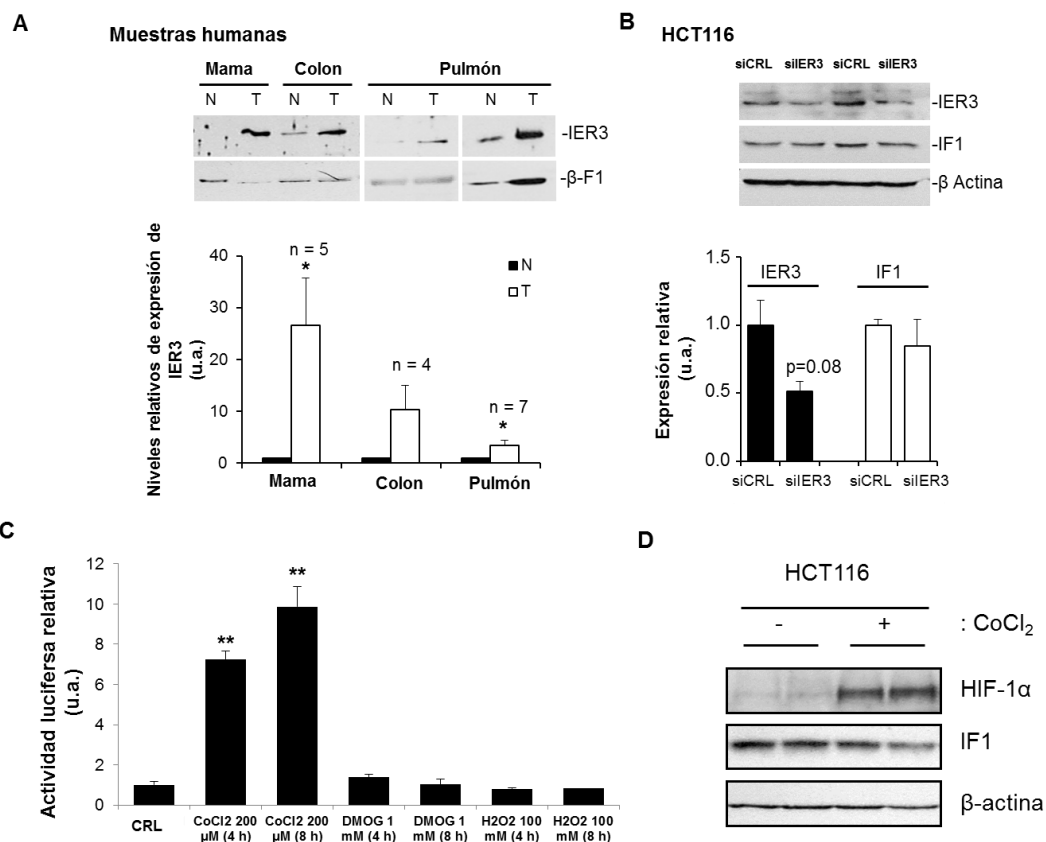


Figura 9. La expresión de IER3 y la hipoxia no cambian los niveles estacionarios de IF1. **A**, Western blots representativos de la expresión de IER3 y de β-F1-ATPasa en biopsias humanas pareadas normales (negro) y tumorales (blanco) de mama, colon y pulmón. Se indica el número de pacientes analizados y está representada en histogramas la expresión de IER3 en tumores relativo a su expresión en las muestras no tumorales como la media \pm SEM. **B**, Células HCT116 se transfectaron con un siRNA ineficiente (siCRL) o con un siRNA siIER3 para después analizar por western blot la expresión de IER3, IF1 y β-actina. Los histogramas muestran la expresión relativa de IER3 e IF1 como la media \pm SEM de 4 muestras distintas. **C**, Actividad luciferasa relativa a las células sin tratar de células HCT116 transfectadas con el plásmido que codifica para una luciferasa bajo el control del promotor de IF1 y tratadas durante 4 y 8 h con CoCl₂, DMOG y H₂O₂. **D**, Células HCT116 fueron tratadas (+) con 200 μM de CoCl₂ o dejadas sin tratar (-) y la expresión de HIF1-α e IF1 analizados por western blot. *p < 0.05 y **p < 0.01 cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.1.5.Regulación de la expresión de IF1 por unión de proteínas de unión a su mRNA: La proteína LRPPRC.

Previamente se ha descrito que los niveles de la proteína de IF1 aumentan en corazón de ratones que carecen de la proteína LRPPRC en la ausencia de cambios en los niveles de expresión de su mRNA (Mourier et al., 2014). Esta proteína se ha descrito como una importante proteína de unión a RNA (RNA-BP) que regula la expresión de distintos mRNAs relacionados con la función

mitocondrial y especialmente mitocondriales (Gohil et al., 2010). Dada la importancia en la expresión de β -F1 se intentó identificar nuevas RBPs que pudieran estar regulando su eficiencia traduccional utilizando una técnica de purificación *in vitro* de RBPs puesta a punto en el laboratorio (Ortega et al., 2010). Esta técnica se basa en la afinidad que tiene la proteína CP por los loops MS2 que se forman en el RNA del bacteriófago MS2: primero se forma un complejo ternario de RNA híbrido transcrito *in vitro* consistente en la secuencia del mRNA de β -F1 con los loops MS2 (h β -F1mRNA), la proteína His-MBP-CP que se une a la construcción de RNA híbrido y una resina de níquel que une a la His-MBP-CP/h β -F1mRNA. Este complejo se incubó con extractos celulares de HCT116 y, tras la elución con RNasa A, el contenido en RBPs analizado por espectrometría de masas (Fig. 10A). Una de las proteínas de unión al h β -F1mRNA fue LRPPRC, lo que aumentaba su potencial como regulador de tanto β F1, la subunidad catalítica de la H^+ -ATP sintasa, como de su inhibidor fisiológico IF1.

Con el fin de profundizar en la relación entre LRPPRC y los mRNAs de IF1 y β F1, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación donde vimos que, en primer lugar, IF1 y LRP130 no interactuaban proteína-proteína en condiciones basales (Fig. 10B). Descartada esta interacción, se hicieron ensayos de inmunoprecipitación de RNA (RNA-IP) en los que inmunoprecipitando LRPPRC, analizamos posteriormente el RNA qué caía con ésta mediante RT-PCRq (Fig. 10D). Como control del funcionamiento de la técnica, se hicieron inmunoprecipitaciones con la ya descrita RNA-BP de β F1 Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP1) (Ortega et al., 2010) y se verificó que interactuaba con dos de sus RNAs descritos (β F1 y c-MYC) (Fig. 10C). Para la RNA-IP con el anticuerpo de LRP130 se incluyeron en el análisis 4 genes distintos: un gen normalizador que no interactúa con LRP130 como GAPDH, un gen cuyo mRNA está descrito que interactúa con la proteína (COXI) (Xu et al., 2012), y por último tanto IF1 como β F1. Lo que pudimos observar era que el mRNA de β F1 no interactuaba con LRP130 pero que, sin embargo, el de IF1 sí interactuaba con ella a niveles comparables a los del control positivo COXI (Fig. 10D). Estos resultados por tanto confirman que LRPPRC puede estar implicada en la regulación post-transcripcional de IF1.

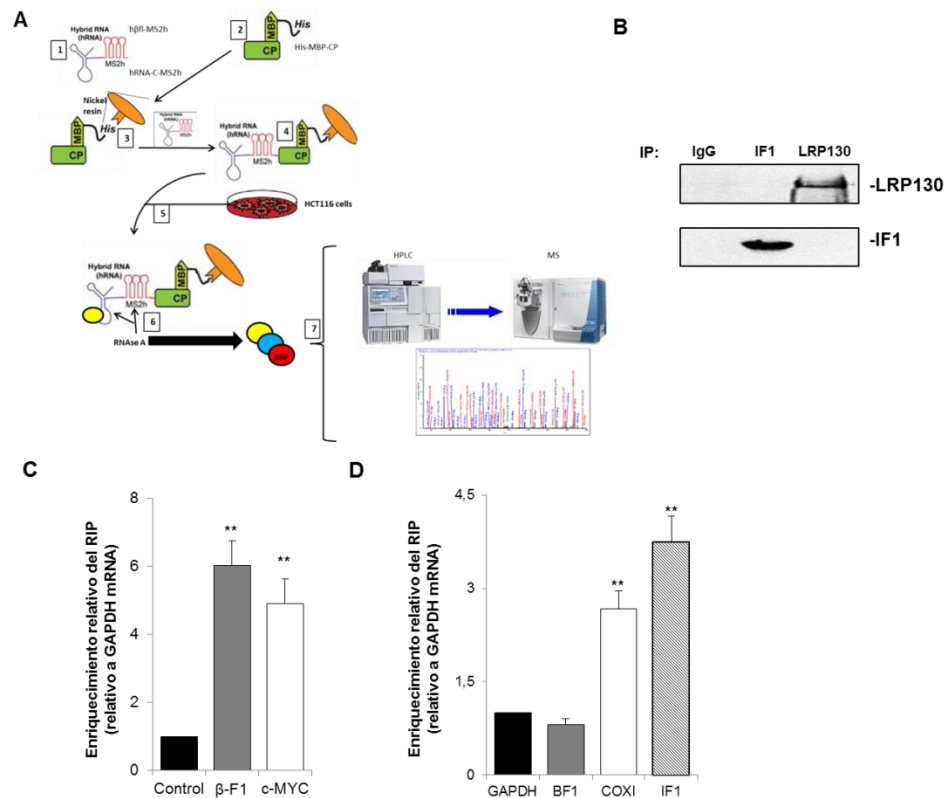


Figura 10. La proteína LRP130 se une al mRNA de IF1. **A**, Esquema resumido de la técnica de purificación *in vitro* de proteínas de unión a mRNA. Para más detalle ver (Ortega et al., 2010). **B**, Análisis por western blot de la ausencia de co-inmunoprecipitación de IF1 con LRP130 utilizando anticuerpos contra cada una de ellas. **C**, Ensayos control de RIP inmunoprecipitando la proteína de unión al mRNA de βF1 con G3BP1. **D**, Ensayos de RIP utilizando un anticuerpo policlonal contra LRP130 y un análisis posterior por RT-PCR cuantitativa, mostrando los niveles relativos al mRNA no interaccionante de GAPDH de los mRNAs estudiados de βF1, IF1 y el control positivo COXI. En **C** y **D** los histogramas representan el enriquecimiento relativo de cada uno de los mRNAs con respecto al mRNA de GAPDH como media \pm SEM de 9 muestras. ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al control por el test de t de Student.

4.1.6.Regulación post-transcripcional por microRNAs.

Estudiamos la posible regulación traduccional por miRNAs debido a su alta prevalencia e implicación en el fenotipo tumoral (Iorio and Croce, 2012). Se escogió la secuencia 3' UTR de IF1 y se analizó con el programa de predicción de unión de miRNAs TargetScanHuman 6.2 (<http://www.targetscan.org/>) (Fig. 11A). Es de destacar que cada una de las 3 isoformas de IF1 posee un 3' UTR distinto, siendo el de la isoforma 1 mayoritaria el más corto, seguido por el de la isoforma 2 (que incluye también el 3' UTR de la isoforma 1) y por último el más largo de la isoforma 3 (que incluye además de una parte exclusiva, los 3' UTR de la isoformas 1 y 2). De todos los miRNAs conservados, decidimos centrarnos en aquéllos dos que estaban más conservados en el 3' UTR de la isoforma 1 y por lo tanto también común a las 3 isoformas (hsa-miR-455-5p y hsa-miR-183-5p). Además, se decidió coger un miRNA que teóricamente no afectara a la isoforma 1 del mRNA de IF1 ya que aparee con una secuencia del 3'UTR de la isoforma 2 (hsa-miR-24-3p). La primera aproximación para ver si estos miRNAs podían estar regulando los niveles de IF1 fue transfectar líneas celulares de colon, pulmón y mama con precursores de cada uno de los miRNAs y posteriormente chequear los niveles de IF1 por Western blot. Sorprendentemente, observamos una disminución clara y dosis dependiente de los niveles de proteína IF1 cuando transfectábamos con pre-miR-24-3p tanto en células de carcinoma de colon HCT116 (Fig. 11B) como en la línea de mama HS578T (Fig. 11C). Los otros dos miRNAs no produjeron ninguna disminución significativa en los niveles de IF1 en estas líneas, e incluso en el caso del pre-miR-455-5p se observó un aumento significativo de los niveles de IF1 (Fig. 11C). En células de pulmón (HOP62), por su parte, sólo el pre-miR-183-5p producía una disminución significativa de los niveles de IF1 cuando se comparaba al miR-CN (Fig. 11D). Una búsqueda bibliográfica sobre el miRNA-24-3p nos reveló que puede presentar un apareamiento atípico que necesita menos afinidad pero que le permite inhibir la traducción de muchos mRNAs de esta manera (Lal et al., 2009a) lo que podía explicar el resultado inesperado de que su expresión disminuye la cantidad de IF1 en diferentes líneas celulares. Un análisis del 3' UTR de la isoforma 1 reveló que efectivamente había una secuencia cebadora 6:1:1 presente que presentaba una muy alta entalpía de unión por el hsa-miR-24-3p y que suponía una posibilidad de regulación de este miRNA para IF1.

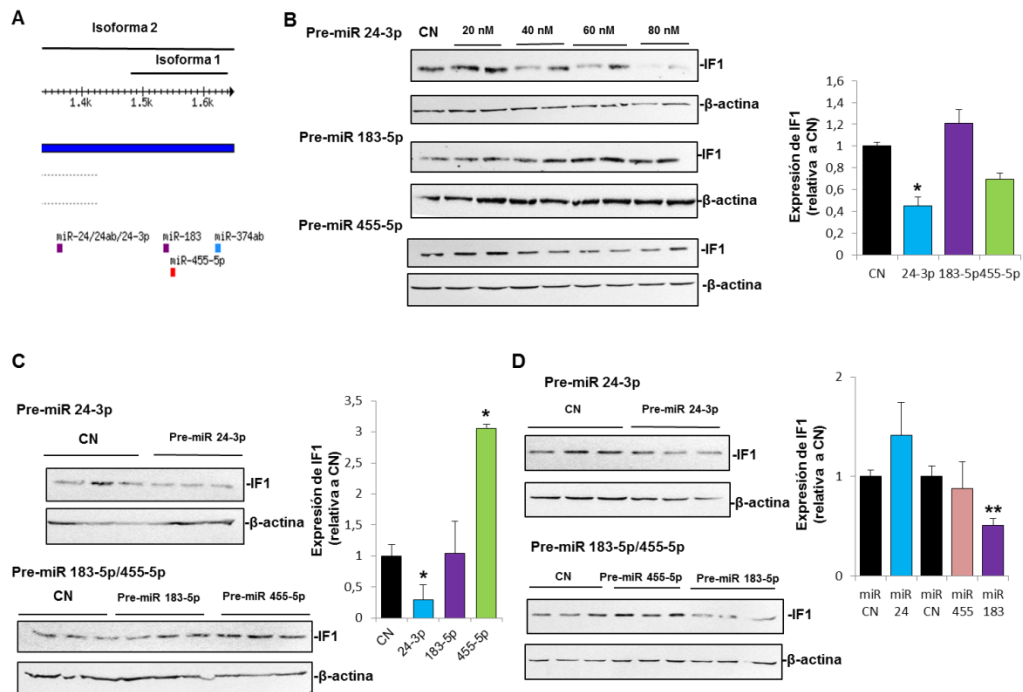


Figura 11. miRNAs y efecto en la expresión de IF1. **A**, Esquema de los microRNAs conservados evolutivamente que aparecen con el 3'UTR de la isoforma 1 de IF1. **B**, Células HCT116 fueron transfectadas transitoriamente con dosis variables de los pre-miRNAs candidatos (24-3p, 183-5p, 455-5p) o con uno control (CN) y el efecto sobre la expresión de IF1 chequeado por western blot. **C**, Como en B pero en células de carcinoma de mama HS578T. **D**, Como en C pero en células tumorales de pulmón HOP62. En B-D se incluyen histogramas representando los niveles relativos de expresión de IF1 respecto al miR-CN en 9 muestras distintas como la media \pm SEM * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al miR-CN por el test de t de Student.

El siguiente paso fue realizar ensayos de medida de actividad luciferasa utilizando el plásmido pMirTarget con el 3'UTR de la isoforma 1 del mRNA de IF1. La co-transfección del plásmido pMirTarget-3'UTR-IF1 con cada uno de los miRNAs reveló que, comparado con el control, el pre-miR 24-3p producía una disminución significativa de la tasa de traducción de la luciferasa (Fig. 12A) lo que sugiere que hay un efecto de los miRNAs mediado por este 3'UTR en la traducción del mRNA. El miR-183-5p no producía cambios en la actividad luciferasa mientras que el miR-455-5p producía un aumento significativo en la traducción de la luciferasa (Fig. 12A). La mutagénesis de varios nucleótidos dentro de la secuencia de apareamiento para el miR-24-3p revirtió los efectos de disminución en la actividad luciferasa indicando que efectivamente esta secuencia de apareamiento no canónico es a través de la que actúa el miR-24-3p (Fig. 12A).

La inhibición traduccional de IF1 por miR-24-3p se confirmó en células HCT116 midiendo la velocidad de síntesis de IF1 utilizando metionina marcada (Fig. 12B). Como se puede apreciar, miR-24-3p produce una inhibición aproximada del 70% de la síntesis de IF1 (Fig. 12B) en ausencia

de cambios en la expresión de su mRNA (Fig. 12C), indicando el silenciamiento traduccional del mRNA de IF1 por miR-24-3p.

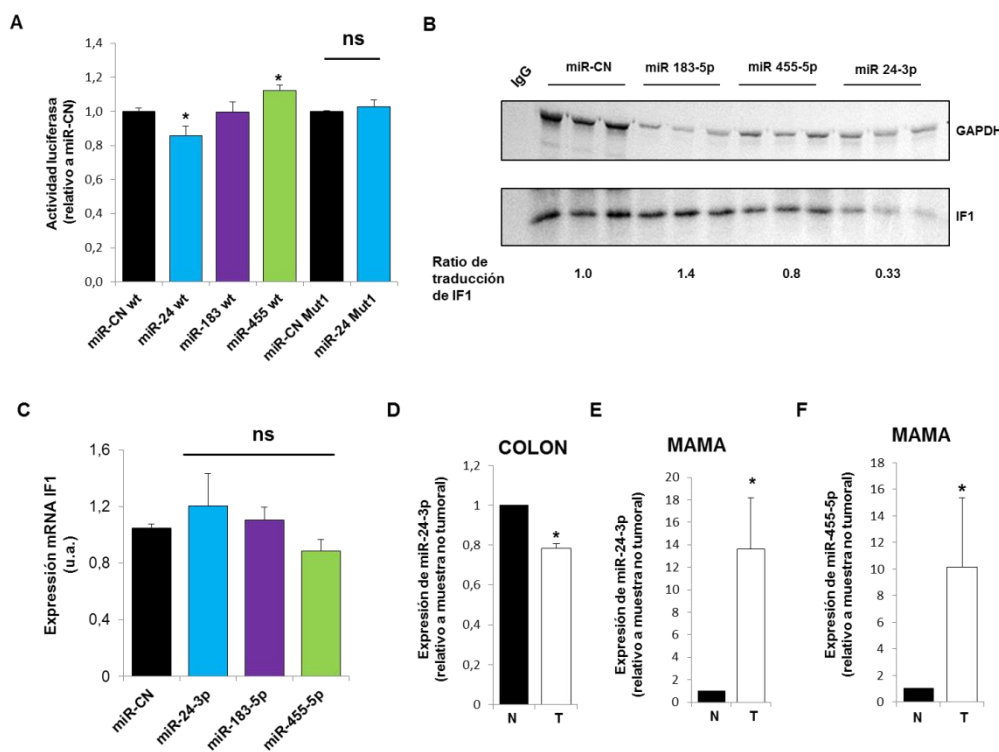


Figura 12. miR-24-3p inhibe la traducción por interacción con el 3'UTR de IF1. **A**, Células HEK293T fueron co-transfectadas con el plásmido reportero pMir-3'UTR-IF1 y con el miRNA correspondiente o bien con la versión mutada pMir-3'UTR-IF1-Mut y su actividad luciferasa medida y normalizada según la señal de RFP. Los histogramas indican la media \pm SEM de 12 muestras distintas. **B**, Determinación en HCT116 de la velocidad de síntesis *in vivo* de las proteínas GAPDH e IF1 en tres preparaciones diferentes. Se indica el ratio de traducción de IF1 respecto al miR-CN. **C**, PCR cuantitativa del contenido relativo del mRNA de IF1 con respecto al miR-CN tras 48 h de transfección de células HCT116 con cada uno de los microRNAs. Los histogramas representan la media \pm SEM de 4 muestras distintas. **D-E**, Expresión de miR-24-3p en tejido normal (N, barras negras) y tumoral (T, barras blancas) de pacientes con carcinomas de colon y mama. **F**, Expresión de miR-455-5p en tejido normal (N) y tumoral (T) de pacientes con carcinoma de mama. En **D-F** los histogramas representan la media \pm SEM de la cantidad relativa del miRNA correspondiente normalizado por la cantidad en miR-U6 en 5 muestras tumorales humanas de colon o mama respecto a sus correspondientes muestras pareadas no tumorales medido por RT-qPCR. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al miR-CN por el test de t de Student.

Para saber si esta modulación de los niveles de IF1 es relevante en el fenotipo tumoral y puede tener alguna relevancia clínica, se analizaron por RT-qPCR los niveles de expresión de miR-24-3p y miR-455-5p que afectan a la expresión de IF1 en muestras pareadas de tejido normal y tumoral de pacientes con carcinomas de colon y mama con respecto a la expresión del miR-U6 que es un microRNA constitutivamente expresado en todos los tejidos. El análisis de una muestra limitada ($n = 5$) reveló que en carcinoma de colon existía una disminución significativa de los

niveles del miR-24-3p (Fig. 12D), mientras que en tejido de mama la expresión de miR-24-3p está muy aumentada (Fig. 12E). Por otro lado, los niveles del miR-455-5p eran superiores en el tumor de mama cuando lo comparábamos al tejido normal (Fig. 12F). Estos resultados, que son preliminares, dan a entender la posible implicación de miR-24-3p y miR-455-5p en la regulación traduccional de la expresión de IF1 en carcinomas de colon y mama, respectivamente.

Otra situación susceptible de regulación por microRNAs de la traducción de IF1 se evidenció en un modelo animal transgénico desarrollado en el laboratorio. En este modelo de ratón, el animal expresa la proteína humana IF1 o su variante constitutivamente activa H49K de manera tejido específico en corazón y regulado por doxiciclina (Dox). Durante el desarrollo de este proyecto pudimos observar que, aunque los ratones eran positivos en genotipo para el gen de IF1/H49K, sin embargo a nivel de proteína muchos ratones no expresaban hIF1 (Fig. 13A). Un análisis de cuántos de estos ratones expresaban hIF1 siendo positivos en genotipo para éste indicó que menos del 50% de los ratones no expresaban hIF1 (Fig. 13B), y todo ello en la presencia del mRNA humano de IF1 y sin diferencias significativas entre aquéllos que expresan la proteína y los que no (Fig. 13C).

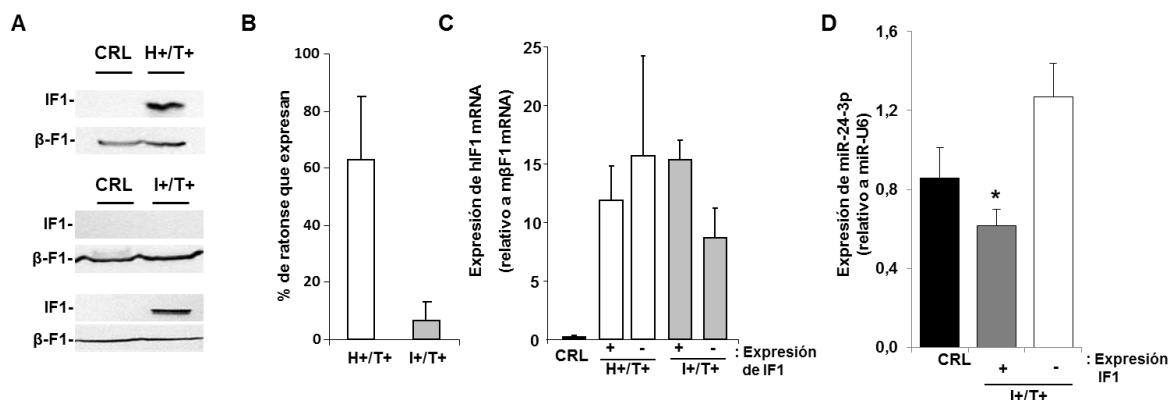


Figura 13. Los niveles de miR-24-3p están aumentados en corazón de ratones transgénicos que no consiguen expresar IF1. **A**, IF1 transgénico no siempre se expresa en corazón de ratones positivos para el gen humano de *ATP1F1*. **B**, Porcentaje de ratones positivos por genotipo para IF1 o H49K que realmente expresan la proteína hIF1. **C**, Expresión de hIF1 mRNA en corazón de animales no transgénicos (CRL) y de animales transgénicos (H⁺/T⁺ o I⁺/T⁺) que expresan (+) o no (-) IF1. **D**, Medida por RT-qPCR de los niveles de miR-24-3p en corazón de ratones de los 3 grupos descritos en **B**. *p < 0.05 cuando se compara los I⁺/T⁺ que expresan con los I⁺/T⁺ que expresan por el test de t de Student. Los resultados en **B-D** son la media ± SEM de 6 (CRL y I⁺/T⁺ que expresan IF1) o 12 animales (I⁺/T⁺ que no expresan IF1).

El estudio por RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión del miR-24-3p en los 3 tipos de ratones: ratones wild type (wt), dobles transgénicos que expresan IF1 (I+/T+e) y dobles transgénicos que no expresan IF1 (I+/T+ne) reveló, consecuentemente con la expresión o no de la proteína, que el miRNA 24-3p se encontraba expresado de manera significativamente más alta en

los ratones que no expresan IF1 cuando se compara con los que sí lo expresan (Fig. 13D) lo que sugiere su probable implicación en el silenciamiento traduccional del mRNA de IF1 humano en el corazón de estos ratones.

4.1.7.Regulación de la expresión de IF1 por control del recambio proteico (degradación).

La homeostasis proteica es crítica en el funcionamiento celular, especialmente relacionado para el fenotipo tumoral (Hetz et al., 2013) y esto es aún más evidente cuando nos referimos a la homeostasis mitocondrial (Altieri, 2013). Es evidente por lo tanto pensar que una regulación de degradación proteica inadecuada de los niveles de IF1 pudiera ser una de las causas de la acumulación de la proteína en distintos tipos de tumor, máxime cuando ya se había apuntado a la existencia de este mecanismo de regulación en trabajos anteriores (Shen et al., 2009). Nuestro primer objetivo fue determinar la tasa de recambio proteico o vida media de IF1. Ensayos de pulso con Met- S^{35} y caza a distintos tiempos seguidos de inmunoprecipitación de IF1 con un anticuerpo monoclonal específico en células humanas de carcinoma de colon nos permitieron analizar la tasa de recambio de IF1 (Fig. 14). El resultado nos indicó que IF1 era una proteína de vida media muy corta, en un rango de 2 a 4 horas ($t_{1/2} = 2-4$ h), algo que contrastaba con la vida media mucho mayor de la mayoría de proteínas mitocondriales tales como la proteína estructural de la mitocondria Hsp60 ($t_{1/2} > 24$ h) (Martinez-Reyes, 2012).

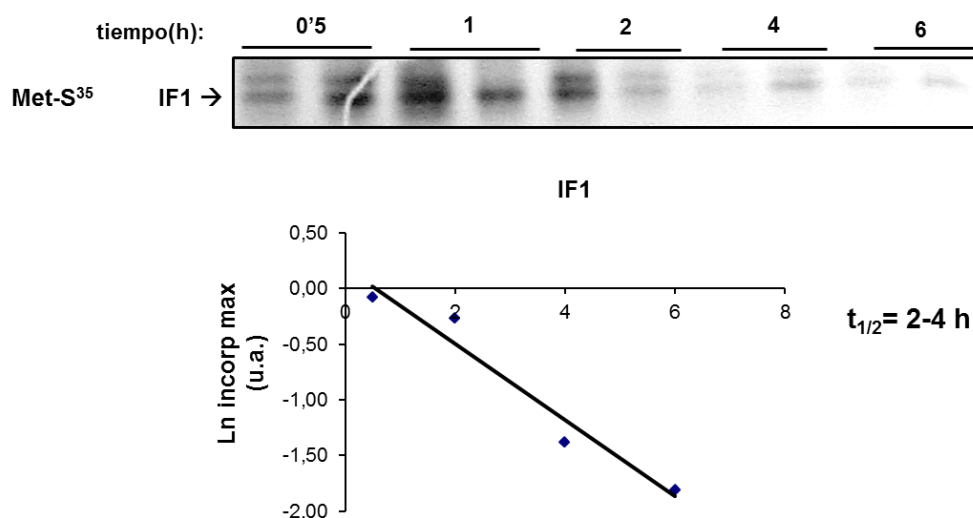


Figura 14. IF1 es una proteína de vida media corta. Se marcaron células HCT116 con Metionina- S^{35} y se recogieron a los tiempos indicados (0.5, 1, 2, 4 y 6 h), inmunoprecipitando después IF1. La fluorografía muestra la migración y la desaparición de la señal en IF1 marcado con el tiempo. El gráfico muestra la cinética de primer orden del decaimiento de IF1 para un experimento representativo. La vida media ($t_{1/2}$) de IF1 se mueve en el rango de 2 a 4 h dependiendo del experimento y se calculó a partir de 10 muestras para cada tiempo indicado.

El hecho de que IF1 fuera una proteína con un recambio proteico tan acelerado ponía de manifiesto la importancia de su ruta de degradación, por lo que experimentos con inhibidores de las distintas rutas se testaron en líneas tumorales humanas procedentes de los cuatro tipos de tejido en los que previamente se observó acumulación de IF1 en el caso tumoral (Fig. 15). Así, células de carcinoma de colon HCT116 y de ovario OVCAR8 aumentan IF1 cuando las células se incubaron con el inhibidor de serín-proteasas AEBSF (Fig. 15A) y esta acumulación se producía a tiempos cortos de incubación, lo que coincidía con la vida media calculada mediante pulso y caza. Sin embargo, las líneas tumorales de mama BT549 y de pulmón HOP62 no respondían a este tratamiento y presentaban niveles invariables de IF1 (Fig. 15A). Asimismo, la incubación de las distintas líneas con el inhibidor del proteasoma MG132 en la misma ventana de tiempo que las incubaciones con AEBSF no afectaban a los niveles de IF1 analizados por western blot (Fig. 15B).

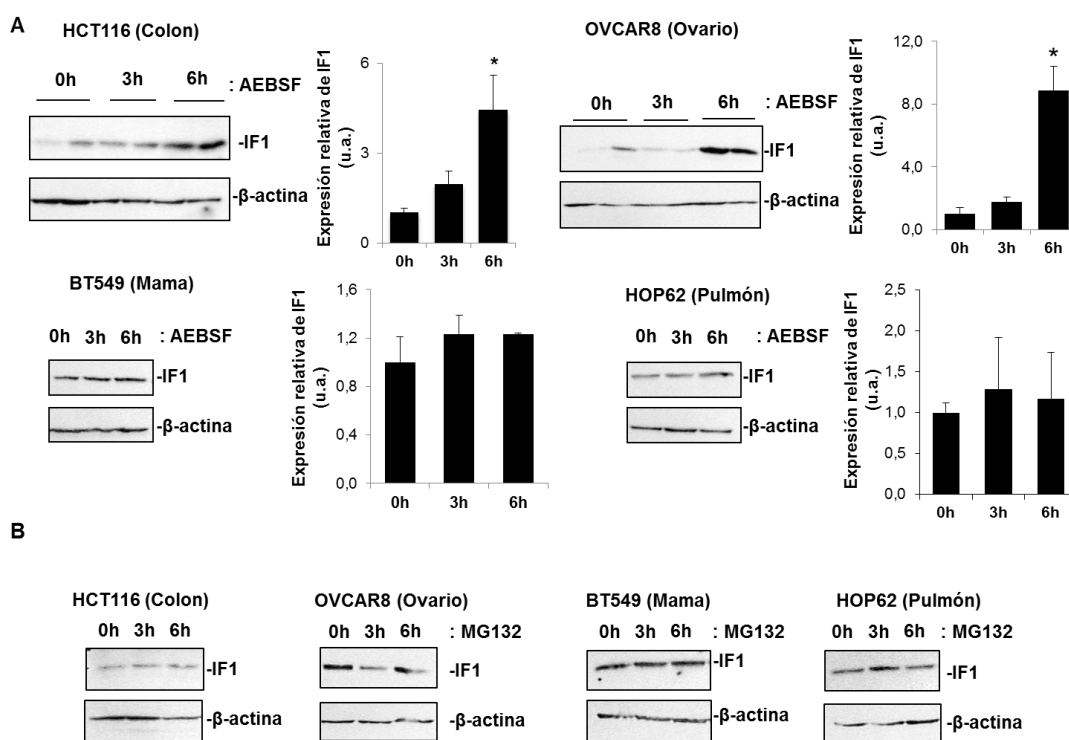


Figura 15. La degradación de IF1 depende de serín-proteasas y es tipo celular específica. **A**, Células de colon (HCT116), ovario (OVCAR8), mama (BT549) y pulmón (HOP62) fueron tratadas a tiempos cortos con 400 mM del inhibidor de serín-proteasas 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoride (AEBSF) a los tiempos indicados para analizar después los niveles de expresión de IF1 y β -actina. Dependiendo del tipo celular hay acumulación (HCT116, OVCAR8) o no (BT549, HOP62) de IF1 en respuesta al tratamiento con el inhibidor. **B**, Los mismos tipos celulares se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 a los tiempos indicados para estudiar los niveles de IF1 y del control de carga β -actina, mostrando la ausencia de efecto en todos los tipos celulares estudiados. Los histogramas muestran la expresión relativa de IF1 con respecto al tiempo 0 h de tratamiento y como la media \pm SEM de 8 muestras distintas. * $p < 0.05$ cuando se compara respecto al tiempo 0 h por el test de t de Student.

Dado que las serín-proteasas y las metalo-proteasas son parte importante de la población proteica mitocondrial, y que muchas de ellas se encargan de la degradación activa de proteínas dentro de la matriz mitocondrial y en el espacio intermembrana, nos propusimos identificar la proteasa o proteasas que estuvieran implicadas en el recambio de IF1. Para ello, realizamos un screening de silenciamiento transitorio de varias proteasas mitocondriales en células HCT116 (Fig. 16). Se estudiaron las serín-proteasas LONP1, CLPP (matriz) y Htra2/Omi (espacio intermembrana); la metalo-proteasa transmembrana YME1L, otra metaloproteasa transmembrana como SPG7 y la peptidasa de matriz PMPCB que se encarga de procesar las secuencias de localización mitocondrial en las proteínas precursoras. El silenciamiento fue analizado 48 h después de la transfección y verificado por western blot (LONP1, Htra2 y CLPP) (Fig. 16A) o por RT-qPCR (YME1L, Spg7 y PMPCB) (Fig. 16B). A pesar de conseguir tasas de silenciamiento superiores al 50% en proteína o mRNA en todos los casos, no apreciamos ninguna acumulación significativa de IF1 ante ninguno de los silenciamientos de las proteasas mitocondriales (Fig. 16). Debido al efecto observado previamente con el compuesto AEBSF, se testó el efecto de silenciar simultáneamente las 3 serín-proteasas (Fig. 16C) y de nuevo no observamos ninguna variación de los niveles de IF1.

Por otro lado, observamos que células HCT116 incubadas con un inhibidor de metaloproteasas como es la o-fenantrolina presentan acumulación de IF1 (Fig. 17A) de acuerdo con (Shen et al., 2009). Debido a los resultados contrapuestos entre el uso de inhibidores farmacológicos y el silenciamiento en cultivo de las proteínas, y dado el frecuente solapamiento de rutas de degradación y de proteínas diana de las proteasas, se repitieron los experimentos de silenciamiento pero esta vez tras someter a las células ya tripsinizadas a un proceso de enriquecimiento mitocondrial. Lo que pudimos observar entonces es que la alta tasa de silenciamiento parcial de la metaloproteasa YME1L producía en estas condiciones una acumulación clara de IF1 que dependía del grado de silenciamiento de la proteasa (Fig. 17B).

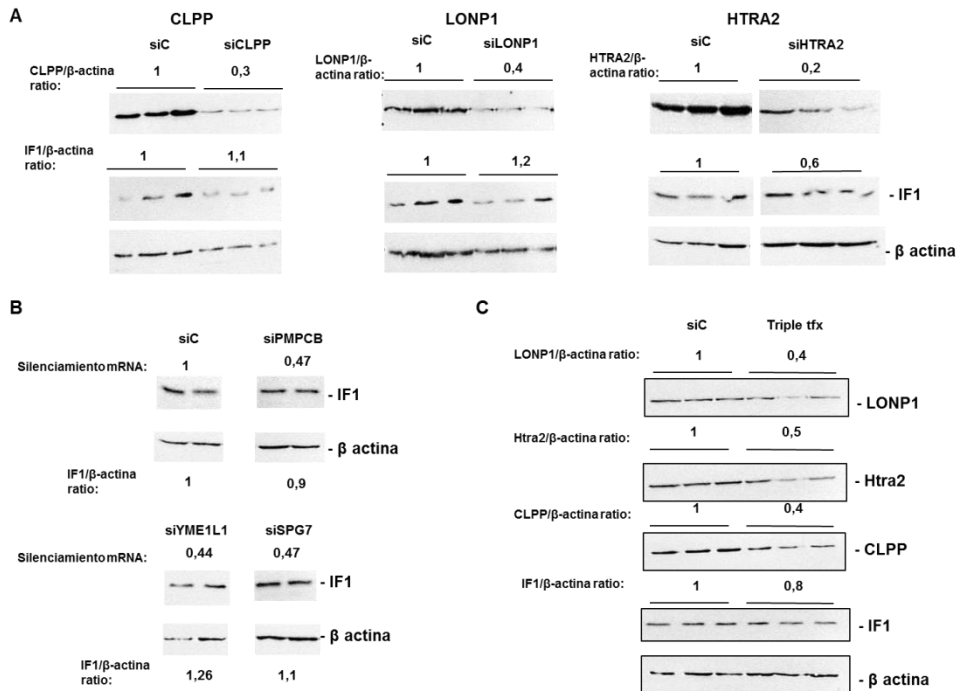


Figura 16. Screening de silenciamiento para la identificación de proteasas implicadas en la degradación de IF1. Células HCT116 fueron transfectadas durante 48 h con 80 nM de un siRNA CRL o con el siRNA especificado para las siguientes proteasas mitocondriales: las serín-proteasas LONP1, CLPP y HTRA2 (**A**) cuyo silenciamiento se verificó por western blot, o las proteasas PMPCB, YME1L y SPG7 (**B**) en las que se determinó el grado de silenciamiento por RT-PCR cuantitativa. Se muestran blots representativos de IF1 y de β-actina y el ratio IF1/β-actina encima de los blots correspondientes a 9 muestras distintas para cada condición. En (**C**) se muestra el silenciamiento transitorio simultáneo de las 3 serín-proteasas mitocondriales así como la ausencia de diferencias en IF1.

El siguiente paso fue verificar si el silenciamiento estable de esta metaloproteasa producía un efecto en los niveles de IF1, por lo que utilizamos una línea celular estable de neuroblastoma que expresa un shRNA contra el mRNA de YME1L amablemente cedido por el Dr. Wiseman (Rainbolt et al., 2015) (Fig. 17C). En esta línea SHSY-5Y pudimos ver que, efectivamente, el silenciamiento de YME1L era muy alto, y en algunos experimentos podíamos observar una clara acumulación de IF1 (Fig. 17C) mientras que en otros los niveles estacionarios de IF1 parecían no variar apenas (datos no mostrados), destacando de nuevo el control de la degradación de IF1 por parte de más de una proteasa mitocondrial y/o su dependencia de señales específicas que promueva su degradación.

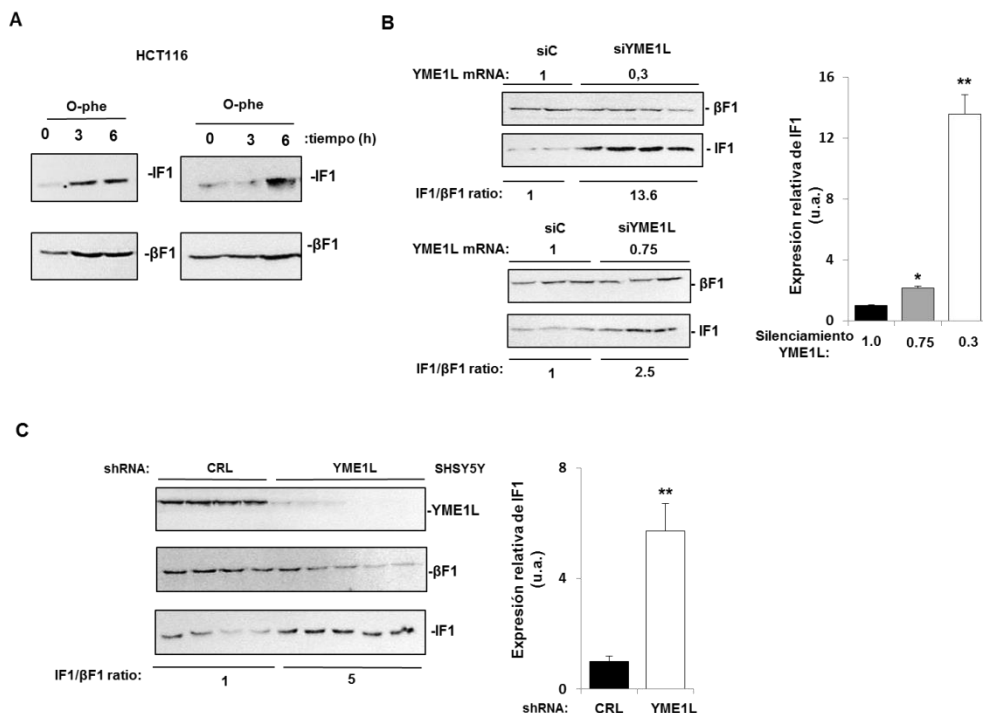


Figura 17. YME1L participa en la degradación mitocondrial de IF1. **A**, Incubación de células HCT116 a los tiempos indicados con el inhibidor de metalo-proteasas O-fenantrolina. **B**, Silenciamiento transitorio de YME1L confirmado por RT-PCR cuantitativa (el silenciamiento se muestra encima de los blots) y análisis por western blot del contenido en IF1 y en β -F1 de fracciones celulares enriquecidas en mitocondria por tratamiento con digitonina. **C**, Análisis por western blot del contenido relativo en YME1L, IF1 y β -F1 de células de neuroblastoma SHSY5Y que presentan un silenciamiento estable de YME1L por medio de un shRNA. En **B-C** el ratio de acumulación de IF1 se muestra debajo de los blots y se incluyen histogramas que representan la acumulación de IF1 con respecto al control como la media \pm SEM de 4 muestras distintas. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara respecto al siCRL o shCRL por el test de t de Student.

4.1.8.El estrés oxidativo disminuye los niveles de IF1.

A pesar de haber visto que el estrés oxidativo generado por la adición de H_2O_2 no producía cambios en la actividad transcripcional del promotor de IF1 (Fig. 9C), era de interés estudiar la potencial regulación de la expresión de IF1 por especies reactivas de oxígeno, al haber sido descrito anteriormente como un generador importante de éstas (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a). Simulamos esta misma situación mediante bloqueo de la cadena respiratoria en el complejo III por adición de antimicina A, con la consecuente generación de ROS, con una dosis pequeña y de duración variable (Fig. 18). Como se observa en la Figura 18A, la adición del compuesto durante 6 y 12 h al medio de cultivo de células HCT116 produce una pérdida progresiva de los niveles de IF1, mientras que la expresión de proteínas mitocondriales (β F1) o citoplasmáticas (GAPDH) no varía. La generación de ROS y en concreto de anión superóxido fue confirmada utilizando la sonda MitoSOX por medio de citometría de flujo (Fig. 18B), donde se observa el

aumento de 3 veces la cantidad de ROS cuando ponemos antimicina A. También se determinó su origen mitocondrial mediante el apantallamiento parcial de los mismos utilizando el compuesto MitoQ (Fig. 18B-C) que también se reflejó en una reversión de los niveles de IF1 medidos por western blot (Fig. 18C) a niveles comparables a los de las células no tratadas cuando añadíamos MitoQ junto a la antimicina A.

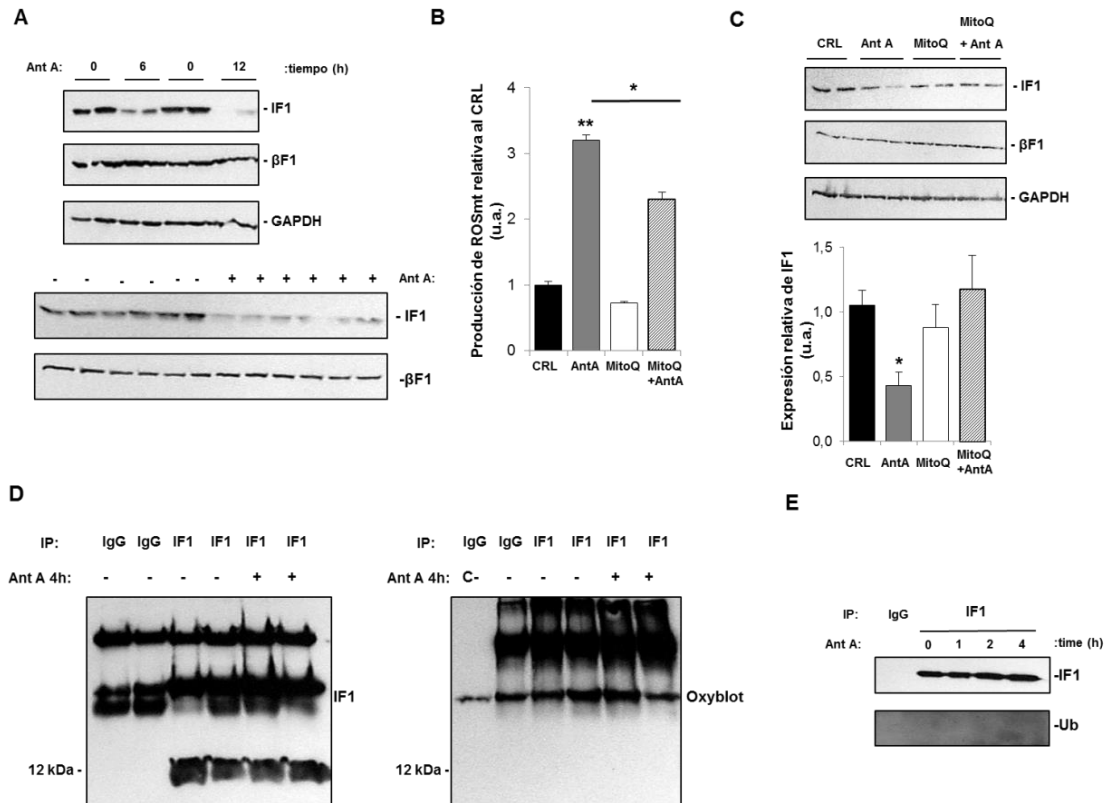


Figura 18. Los ROS mitocondriales producidos por la Antimicina A disminuyen los niveles de IF1. **A**, Tratamientos a los tiempos indicados de células HCT116 con antimicina A 50 μ M y posterior análisis de los niveles de IF1, β F1 y GAPDH como control de carga. **B**, Histogramas representando los niveles relativos a células HCT116 sin tratar (CRL) de los ROS mitocondriales generados con el tratamiento de 6 h de AntA así como su apantallamiento parcial cuando se tratan junto al scavenger de ROSmt MitoQ. Se representa la media \pm SEM de 5 muestras distintas. **C**, El apantallamiento de ROSmt por MitoQ se observó también a nivel de proteína con el análisis por western blot de IF1, β F1 y GAPDH. Los histogramas muestran los niveles relativos de IF1 a la proteína control GAPDH como la media \pm SEM de 5 muestras distintas. En **B-C** * p < 0.05 y ** p < 0.01 cuando se comparan respecto al CRL sin tratar por el test de t de Student. **D**, Oxyblot de IF1 inmunoprecipitado de células sin tratar (-) o tratadas (+) durante 4 h con AntA. Se muestran la correcta inmunoprecipitación de IF1 así como los controles de inmunoprecipitación utilizando una IgG inespecífica y un carril control negativo de la reacción de oxidación (C-). **E**, Se inmunoprecipitó IF1 de células HCT116 tratadas con AntA por los tiempos indicados, chequeándose la correcta inmunoprecipitación por western blot así como la ausencia de ubiquitinación en la proteína inmunoprecipitada.

Con objeto de verificar la posible implicación de modificaciones post-traduccionales de IF1 implicadas en promover una mayor degradación de la proteína en respuesta a esta señal de ROS mitocondriales, estudiamos si se podía estar produciendo: i) la ubiquitinación de la proteína (señal clásica de degradación proteica), o ii) una oxidación de la misma. Se hicieron tratamientos de 4 h de antimicina A tras los cuales se inmunoprecipitó IF1 con un anticuerpo monoclonal específico y se analizó el contenido de oxidación proteica (Fig. 18D) o de ubiquitinación (Fig. 18E) en el IF1 inmunoprecipitado. Se puede observar que la señal de estrés oxidativo no produce modificaciones significativas en la oxidación y en la ubiquitinación de IF1, descartando que alguna de estas modificaciones funcione como señal que promueva su degradación.

Trabajos previos del laboratorio (Martinez-Reyes, 2012) han puesto de manifiesto la importancia de la señalización por ROS para la síntesis de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. Puesto que la vida media de IF1 es muy corta, es lógico pensar que gran parte del control de su expresión radique en el control de su síntesis. En este sentido, el siguiente paso fue analizar, mediante experimentos de marcaje radioactivo con aminoácidos marcados con C^{14} o S^{35} , cuáles eran las velocidades iniciales de síntesis de IF1, β F1 y GAPDH/Hsp60 en respuesta a Ant A para saber si el efecto era específico o general (Fig. 19). Los resultados utilizando tanto la mezcla de aminoácidos con C^{14} (Fig. 19A) como la metionina marcada con S^{35} (Fig. 19B) confirmaron que la disminución en la velocidad de síntesis en IF1 era específica y que tanto β F1 como GAPDH/Hsp60 no disminuían significativamente su tasa de síntesis (Fig. 19A-B), y todo esto en ausencia de cambios en los niveles de mRNA de IF1 o β F1 (Fig. 19C) poniendo de manifiesto que se trata de un control traduccional.

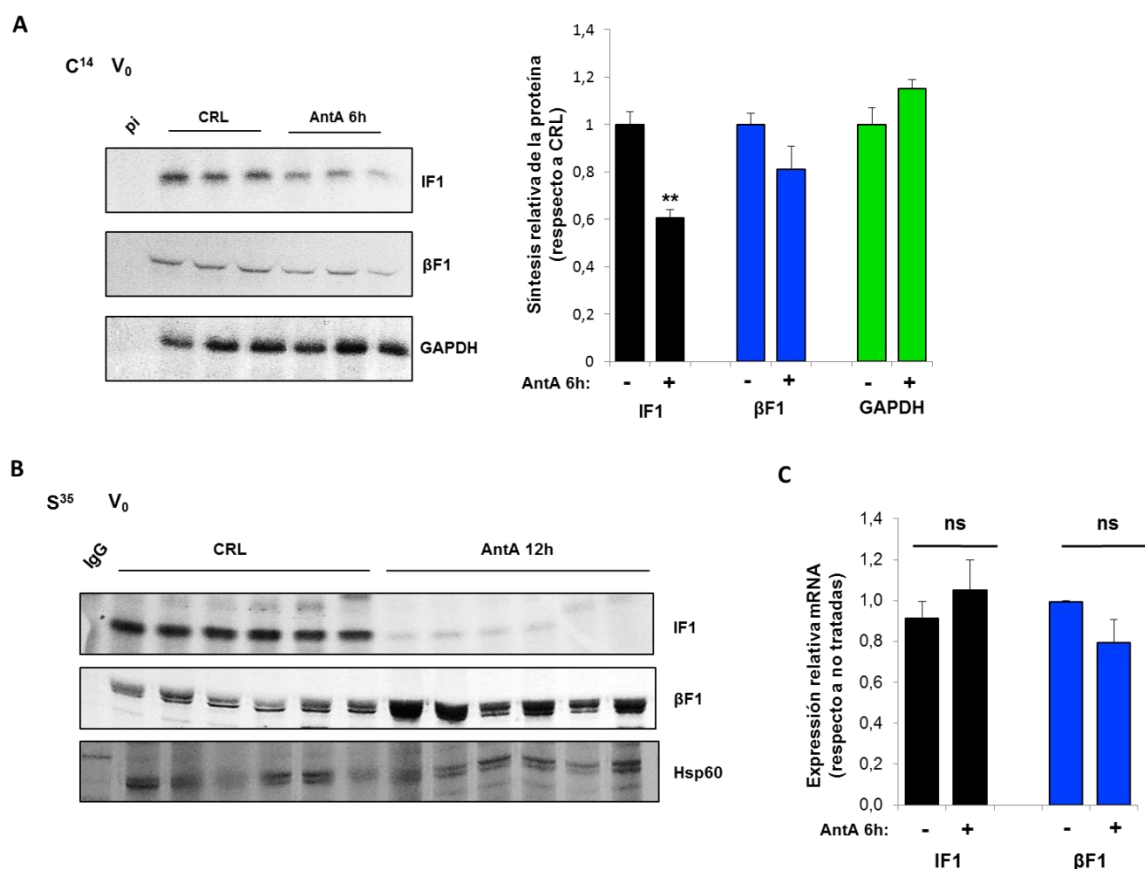


Figura 19. El tratamiento con antimicina A produce un arresto traduccional selectivo de IF1. A, Ensayos de velocidad inicial de traducción en células HCT116 incubadas con una mezcla de aminoácidos marcados con C^{14} . Se analizó por inmunoprecipitación de IF1, β F1 y GAPDH con posterior fluorografía. Los histogramas representan la media \pm SEM de 3 muestras distintas respecto a las muestras CRL. ** $p < 0.01$ cuando se comparan respecto al CRL sin tratar por el test de t de Student. **B,** Mismos ensayos pero utilizando Met- S^{35} y a 12 h de tratamiento de Ant A. **C,** Ensayos de PCR cuantitativa de células HCT116 tratadas (+) o no (-) con Ant A durante 6 h mostrando el contenido relativo a GAPDH de IF1 y β F1 con respecto a las células no tratadas (-). Los histogramas representan la media \pm SEM de 5 muestras distintas respecto a las muestras CRL.

4.2. MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE IF1.

4.2.1. IF1 está fosforilado en líneas celulares de carcinomas humanos.

Se ha descrito la fosforilación de IF1 humano (Christensen et al., 2010; Sharma et al., 2014; Zhao et al., 2011; Zhou et al., 2013). Por la posible implicación de la fosforilación como mecanismo de regulación de la actividad de IF1 decidimos estudiar su posible fosforilación en distintas líneas celulares humanas. Extractos de líneas de colon (HCT116), cérvix (HeLa), mama (BT549), pulmón (HOP62) y ovario (OVCAR8) fueron fraccionados en geles de 2-Dimensiones para posteriormente analizar por western blot el enfoque de IF1 y de β F1 (Fig. 20A), ésta última utilizada como control del correcto electroenfoco de las muestras.

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de isoformas proteicas de IF1 que diferían en su punto isoeléctrico (pI) dependiendo de la línea celular considerada. En células de mama y pulmón la isoforma prevalente de IF1 tiene un pI experimental de 8.9, muy cercano al pI teórico de la proteína. Sin embargo, en células de colon, cérvix y ovario, IF1 está representado por 2 isoformas proteicas principales con pIs en el rango de 7.6-8.1 (Fig. 20A). La existencia de isoformas más ácidas de la proteína sugería una modificación covalente de IF1 por fosforilación. Esto fue confirmado en la línea celular de HCT116 por tratamiento de los lisados con una fosfatasa inespecífica CiP (Fig. 20B) que promovía el cambio de IF1 hacia la región más básica del gel, coincidiendo con el punto más básico de IF1 observado tanto en pulmón como en mama (pI 8.9) (Fig. 20A).

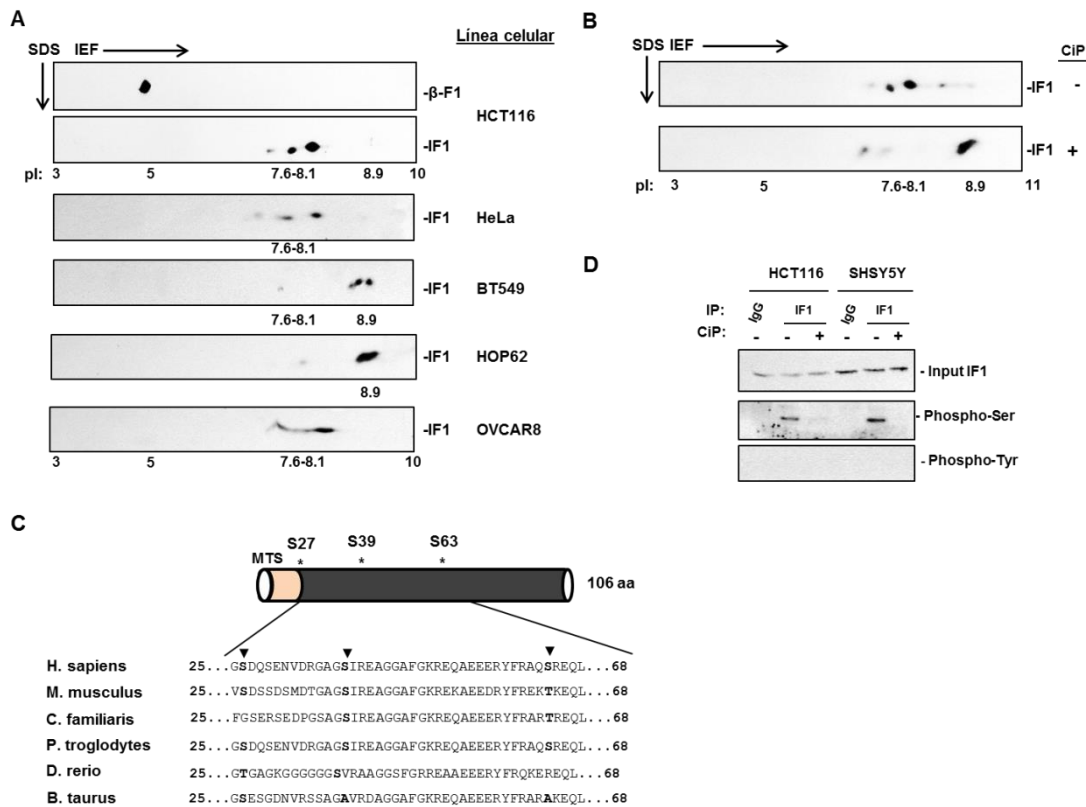


Figura 20. IF1 está fosforilado en líneas tumorales humanas. **A**, Extractos proteicos de células HCT116, HeLa, BT549, HOP62 y OVCAR8 fueron fraccionados en geles 2D y revelados con anticuerpos contra β-F1-ATPasa e IF1. **B**, Extractos de células HCT116 fueron tratados (+) o no (-) con la fosfatasa CiP y fraccionados en geles 2D. El pI experimental de IF1 y βF1 se incluye debajo de los blots. **C**, Análisis de la secuencia de IF1 y su conservación en distintas especies, destacando aquellos residuos serina conservados. **D**, IF1 inmunoprecipitado de extractos celulares de HCT116 y SHSY5Y fueron tratados (+) o no (-) con la fosfatasa CiP y su contenido en Phospho-Ser y Phospho-Tyr analizado por western blot. Se incluyen IgGs no específicas como control de la inmunoprecipitación.

Un análisis *in silico* (NetPhos 2.0) de la secuencia de IF1 (Fig. 20C) nos indicó que, consistentemente con las descripciones de fosfoproteómica de otros grupos (Christensen et al., 2010; Sharma et al., 2014; Zhao et al., 2011; Zhou et al., 2013), los residuos Ser39 y Ser63 junto a la Tyr58 eran los más aptos para su fosforilación. Con el fin de saber si el/los residuo/s fosforilados eran serina, tirosina o ambos, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal anti-IF1 de extractos celulares preincubados o no con la fosfatasa CiP revelando posteriormente con un anticuerpo anti-phospho-Ser, confirmando la presencia de residuos serinas fosforilados en IF1 de células HCT116 y SHSY-5Y (Fig. 20D). El inmunoprecipitado de IF1 de HCT116 con un anticuerpo anti-phospho-Tyr no reveló señal positiva, apoyando que IF1 está fosforilado en estas células en residuos de serina (Fig. 20D).

4.2.2. La fosforilación de IF1 es PKA-dependiente.

En el análisis *in silico* de predicción de sitios de fosforilación también se introdujo una predicción de qué proteínas quinasas podían estar implicadas en la fosforilación de cada residuo (PKAps, GPS 2.0). Los residuos de serina se encuentran en motivos proteicos afines a tres quinasas: proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA), proteína quinasa C (PKC) y quinasa dependiente de calcio/calmodulina II/IV (CAMK-II/IV), habiendo sido descritas dentro de la mitocondria (Pagliarini and Dixon, 2006) o unidas a la membrana externa mitocondrial (Gerbeth et al., 2013).

Debido a la implicación de PKA en la regulación de la respiración mitocondrial por fosforilación sobre proteínas de los complejos I (Papa et al., 2012) y IV (Acin-Perez et al., 2011) de la CTE, quisimos probar si la inhibición o activación de esta quinasa producía algún efecto sobre el estado de fosforilación de IF1. Para esto, células HCT116 fueron tratadas con un activador (db-cAMP) o inhibidores (H89, PKI) de PKA y la distribución de isoformas covalentes de IF1 analizadas por geles en 2D después de comprobar que no había cambios relevantes en el contenido estacionario de IF1 a nivel de proteína (Fig. 21A). El tratamiento de las células con los dos inhibidores de PKA, el péptido inhibidor pseudosustrato PKI o el inhibidor competitivo H89, mostraron la presencia de IF1 defosforilado (pI 8.9) (Fig. 21B). Por contra, cuando las células eran tratadas con el activador de PKA permeable a las membranas db-cAMP, todo IF1 estaba en estado fosforilado (pI 7.6-8.1) (Fig. 21B).

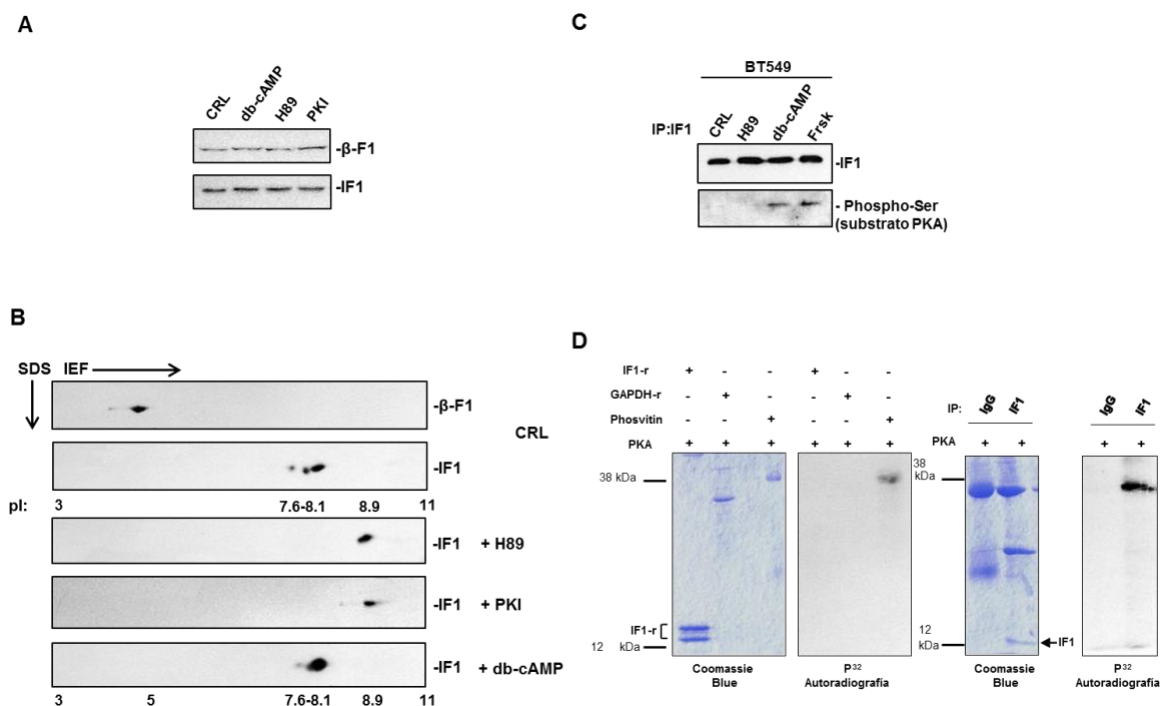


Figura 21. PKA fosforila IF1. **A**, Western blot de células HCT116 tratadas con db-AMPC, H89 o PKI reveló la ausencia de cambios en el contenido en estado estacionario de IF1 cuando se comparó con células sin tratar (CRL). **B**, Células HCT116 se dejaron sin tratar (CRL) o fueron tratadas con los inhibidores de PKA H89 o PKI, o con el activador db-cAMP, y los extractos celulares fraccionados en geles bidimensionales. **C**, Células BT549 fueron dejadas sin tratar (CRL) o tratadas con H89, db-AMPC o forskolina (Frsk), analizando el contenido en IF1 fosforilado por incubación del IF1 inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-fosfo-serina específico de sustratos de PKA. **D**, Ensayos quinasa *in vitro* utilizando IF1 recombinante purificado (IF1-r) o IF1 endógeno inmunoprecipitado de células HCT116 tratadas con H89 (IF1) y en presencia de PKA recombinante. Se incluyen GAPDH como control negativo y phosvitina como control positivo. Se incluye el Coomassie blue como control de carga.

Western blots de IF1 inmunoprecipitado de células de mama BT549, que presentaban la mayoría de IF1 en su estado defosforilado (pI 8.9), mostraron la ausencia de inmunoreactividad hacia un anticuerpo anti-phospho-Ser específico de motivos PKA cuando las células eran dejadas sin tratar o tratadas con el inhibidor de PKA H89 (Fig. 21C). Sin embargo, IF1 fosforilado fue inmunoprecipitado de la misma línea celular tratada con db-cAMP o con el activador de adenilil-ciclasas forskolina (Fig. 21C), apoyando así la regulación diferencia de la fosforilación de IF1 por PKA en diferentes células de carcinoma.

Con objeto de estudiar que IF1 pueda ser una proteína diana directa de PKA, se hicieron ensayos quinasa *in vitro* (Fig. 17D) utilizando proteína recombinante IF1 (IF1-r) (Sanchez-Cenizo et al., 2010) o proteína IF1 endógena inmunoprecipitada de células HCT116 previamente tratadas con H89 (IF1 defosforilado). Como controles internos se pusieron GAPDH recombinante (GAPDH-r; control negativo) y phosvitina (control positivo), conocido sustrato de PKA. A pesar de mostrar claramente la presencia de tanto IF1-r como IF1 endógeno por tinción con azul de Coomassie, y la correcta fosforilación de phosvitina, ni la proteína recombinante ni la endógena defosforilada se

fosforilaron in vitro por PKA (Fig. 21D), sugiriendo que la fosforilación de IF1 puede requerir de proteínas andamio del entorno celular, algo muy común en la regulación espacial y temporal de la actividad de PKA (Wong and Scott, 2004).

4.2.3. La defosforilación de IF1 promueve su unión al complejo F1-ATPasa.

Una vez vista la regulación de la fosforilación de IF1 por PKA, quisimos saber si esta fosforilación podía estar afectando a su capacidad de unirse al complejo de la H^+ -ATP sintasa. Para ello se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación de IF1 utilizando un anticuerpo policlonal contra la subunidad catalítica β F1-ATPasa (Cuezva et al., 2002) en células HCT116 que estuvieron sin tratar o tratadas con inhibidores (H89, PKI) o activador (db-AMPC) de la fosforilación de IF1 (Fig. 22A). Las células no tratadas (CRL) o tratadas con db-AMPC mostraron ausencia de co-inmunoprecipitación de IF1 con la subunidad β de la H^+ -ATP-sintasa (Fig. 22A). Sin embargo, células tratadas con ambos inhibidores, y por lo tanto con IF1 en su estado defosforilado, presentaban altos niveles de IF1 co-inmunoprecipitado con esta subunidad (Fig. 22A). Experimentos similares utilizando otro anticuerpo policlonal pero esta vez contra el complejo F1-ATPasa (Valcarce et al., 1988), confirmaron que el estado defosforilado de IF1 es requerido para su interacción y unión al complejo H^+ -ATP sintasa (Fig. 22B). Es destacable que en algunos experimentos una pequeña cantidad de IF1 era inmunoprecipitada en células CRL HCT116 (Fig. 22B), sugiriendo una potencial regulación de la fosforilación de IF1 dependiendo de las condiciones celulares.

4.2.4. IF1 defosforilado inhibe tanto la actividad hidrolasa como sintasa de la H^+ -ATP sintasa.

Lo siguiente fue estudiar el efecto de la fosforilación de IF1 sobre las dos actividades enzimáticas del enzima: la hidrólisis y la síntesis de ATP. Para ello, células HCT116 fueron dejadas sin tratar, tratadas con el inhibidor de PKA H89 o con el activador db-AMPC, tras lo que se les aisló su contenido en mitocondrias y se realizó la medida de las actividades hidrolítica (Fig. 22C) y sintética (Fig. 22D-E). Las células tratadas con db-cAMP presentaban una actividad ATP hidrolasa similar a la de las células control, mientras que las mitocondrias de células tratadas con H89, y por lo tanto conteniendo IF1 defosforilado, tenían una actividad hidrolasa claramente disminuida (Fig. 22C), sugiriendo que la fosforilación de IF1 previene su acción inhibidora sobre esta actividad hidrolítica.

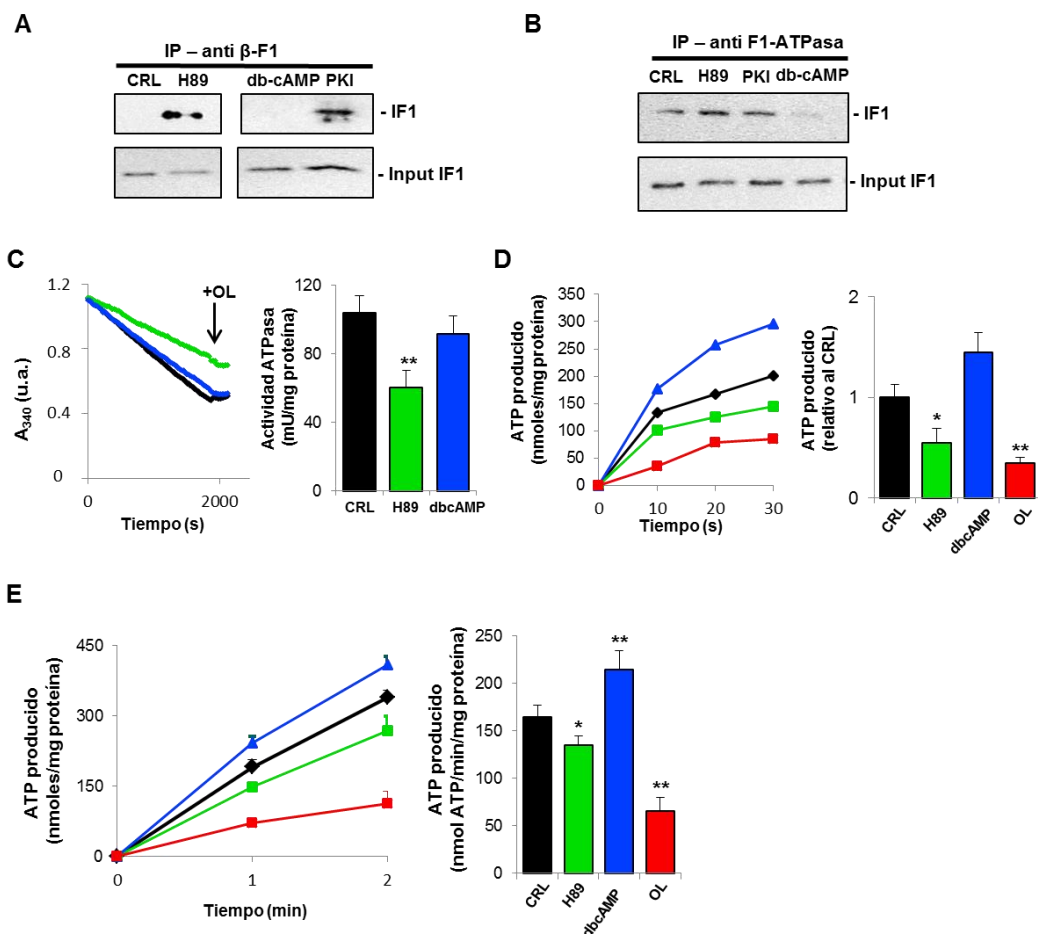


Figura 22. IF1 defosforilado se une e inhibe las actividades hidrolasa y sintasa de la H^+ -ATP sintasa. **A**, Se inmunoprecipitó β -F1-ATPasa de extractos celulares de HCT116 tratadas con H89, PKI, db-AMPC o dejadas sin tratar (CRL), y el IF1 co-inmunoprecipitado analizado por western blot. **B**, Lo mismo que en A pero utilizando un anticuerpo policlonal contra F1-ATPasa para la inmunoprecipitación. **C**, Actividad ATP hidrolítica de la ATP sintasa en mitocondria aislada de células HCT116 dejadas sin tratar (CRL, negro), tratadas con H89 (verde) o con db-cAMP (azul). Donde se indica, se añadió 30 μ M de oligomicina (OL, rojo). **E**, Tasas de producción de ATP en mitocondria aislada de HCT116. **F**, Tasas de producción de ATP en células permeabilizadas con digitonina. Las barras representan la media \pm SEM de cuatro a cinco muestras distintas. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se compara con el CRL por el test de t de Student.

De la misma manera, se determinó la actividad ATP sintética del enzima en mitocondria aislada, revelando que la producción de ATP cuando IF1 está en su estado defosforilado está igualmente disminuido comparado con las mitocondrias control, de manera similar a las mitocondrias incubadas con oligomicina (OL) (Fig. 22D). Asimismo, se observó un aumento de la capacidad ATP sintética en células tratadas con db-cAMP (Fig. 22D). Además, quisimos medir esta capacidad de síntesis de ATP en células HCT116 permeabilizadas con digitonina (Fig. 22E), de nuevo observando que el enzima presentaba una inhibición significativa cuando las células eran tratadas con H89 y comparadas con las CRL. Sin embargo células tratadas con db-cAMP tenían

significativamente aumentado esta tasa de síntesis de ATP (Fig. 22E). En general, estos resultados respaldan que IF1 en su estado defosforilado se une e inhibe la H^+ -ATP-sintasa tanto en su actividad ATP hidrolítica como sintética, mientras que IF1 fosforilado no es capaz de interaccionar y, por lo tanto, no puede interferir ni con la actividad ATP sintética ni con la hidrolítica del complejo V.

4.2.5. La fosforilación de serina 39 regula la actividad de IF1.

Con el fin de identificar los residuos potencialmente implicados en la regulación de la interacción de IF1 con la H^+ -ATP sintasa se generaron en el laboratorio las mutaciones puntuales que generan los fosfo-mutantes (S27A, S39A y S63A) y fosfo-miméticos (S27E, S39E y S63E) de los residuos de serina presentes en la proteína IF1 madura (Fig. 20C).

En primer lugar, y dado que se empezó a trabajar con un modelo de sobreexpresión transitoria, se transfectaron células HCT116 con un plásmido que codifica la versión salvaje (wt) de IF1 viendo que efectivamente la sobreexpresión es clara y que, además, el estrés celular de la transfección genera un cambio del IF1 tanto endógeno como sobreexpresado hacia la defosforilación (Fig. 23A). También se trataron estas células con IF1 sobreexpresado con efectores de PKA donde pudimos ver que el tratamiento con un activador como forskolina producía que una parte de IF1 se situara en la zona más ácida correspondiente a las formas fosforiladas del mismo, mientras que con H89 todo el IF1 se encontraba en su forma defosforilada (Fig. 23A).

El siguiente paso fue analizar el efecto de la expresión tanto del IF1 wt como de los mutantes puntuales en la capacidad de sintetizar ATP en células HCT116 permeabilizadas (Fig. 23B). Consecuentemente con los datos anteriores, la sobreexpresión del IF1 wt produjo una disminución significativa de los niveles de ATP producidos (Fig. 23B), y entre el resto de mutantes solo el S39A tuvo un efecto negativo significativo en esta actividad cuando se comparaba con IF1 y, especialmente, con los del correspondiente fosfo-mimético S39E, que tenía una producción de ATP similar al control transfectado con el plásmido vacío (Fig. 23B). Tanto los residuos S27 como S63 no presentaron estas diferencias en actividad de ATP sintasa entre el mutante A y el E, por lo que decidimos centrar el estudio en la S39 que además es el residuo más conservado (Fig. 20C).

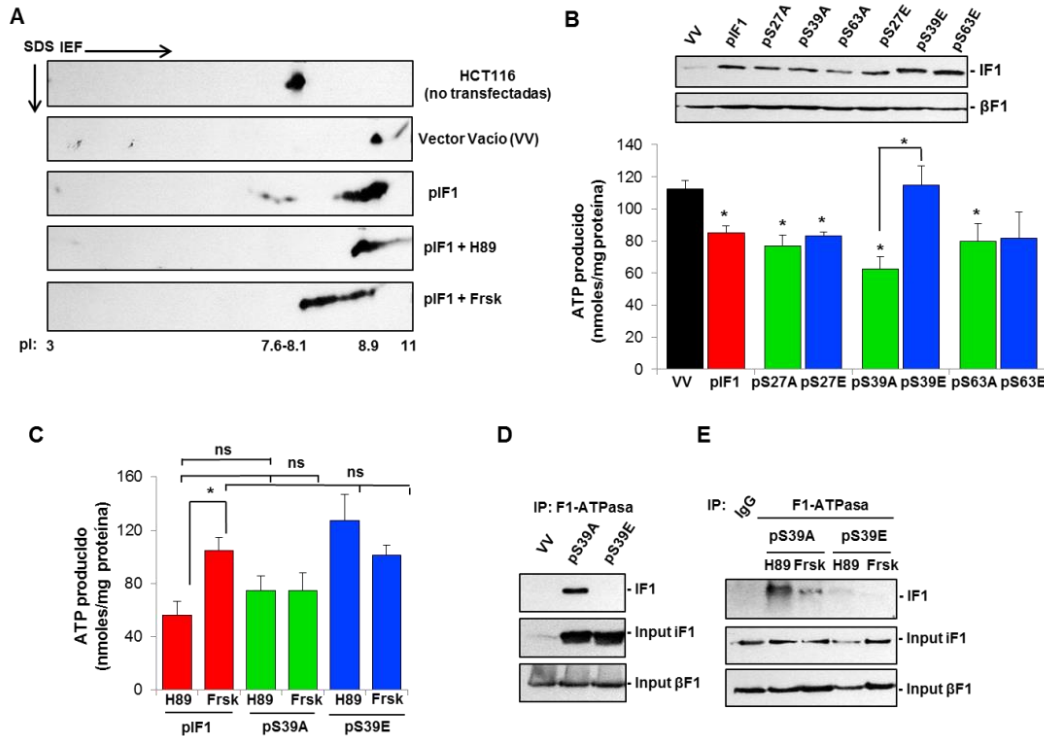


Figura 23. La fosforilación de S39 regula la actividad de IF1. **A**, Células HCT116 no transfectadas o transfectadas con un vector vacío (VV) o con pIF1 y tratadas o no con H89 o Frsk fueron fraccionadas en geles bidimensionales. **B**, Actividad ATP sintética en células permeabilizadas sobreexpresando el plásmido de IF1 wt (pIF1, rojo), los fosfomutantes de IF1 (pS27A, pS39A, pS63A; verde) o los fosfo-miméticos de IF1 (pS27E, pS39E, pS63E; azul). **C**, Lo mismo que en B pero tratando las células con H89 o Frsk. **D-E**, Extractos celulares de HCT116 transfectadas con el VV, pS39A o pS39E no tratadas (**D**) o tratadas con H89 y Frsk (**E**) fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-F1-ATPasa y el IF1 co-inmunoprecipitado identificado por western blot. Se incluyen los inputs de IF1 y de β F1. En B y C, las barras indican la media \pm SEM de cuatro a cinco muestras distintas. *p < 0.05 cuando se comparan por el test de t de Student. ns, no significativo.

Consistente con el papel de la fosforilación de esta S39 en la regulación de la actividad inhibitoria de IF1, observamos que en las células sobreexpresando S39A el tratamiento con Frsk no atenuaba la inhibición de la actividad de la ATP sintasa, cosa que sí ocurría claramente en las que expresaban el IF1 wt (Fig. 23C). Consecuentemente, células sobreexpresando S39E presentaban actividades ATP sintasa mayores que las células expresando IF1 o S39A, y además de nuevo no existían diferencias significativas entre la incubación de estas células con H89 o con Frsk (Fig. 23C).

Ya que anteriormente hemos visto que la inhibición de la ATP sintasa correlacionaba con la unión de IF1 al complejo y con el estado de fosforilación (Fig. 22A-B), se realizaron de nuevo experimentos de co-inmunoprecipitación en células HCT116 sobreexpresando la forma S39A o S39E de IF1. Se inmunoprecipitó la ATP sintasa utilizando de nuevo el anticuerpo policlonal contra

la F1-ATPasa y se analizó en el inmunoprecipitado su contenido en IF1, apreciándose claramente la presencia de la forma S39A y la ausencia de niveles de la forma no inhibidora S39E (Fig. 23D). La co-inmunoprecipitación del S39A y no del S39E también se reprodujo en presencia de tratamientos celulares con H89 y con Frsk (Fig. 23E). Estos resultados confirman la importancia de la fosforilación de IF1 para prevenir la unión y subsiguiente inhibición de la ATP sintasa y demuestran la importancia del residuo conservado S39 en este proceso.

4.2.6. La defosforilación de IF1 promueve la glucólisis aerobia.

Dado que la fosforilación de proteínas mitocondriales mediada por PKA afecta a la actividad de varios complejos respiratorios, decidimos estudiar el efecto de los distintos reguladores de PKA en la respiración sensible a oligomicina (OSR), la cual es una medida de la actividad de la H^+ -ATP sintasa. Los resultados de medida de consumo de oxígeno por SeaHorse revelaron que las células HCT116 tratadas con los inhibidores de PKA presentan una profunda reducción de la OSR (Fig. 24A). Para verificar que este efecto se debía principalmente a IF1 y no a algún efecto de otra proteína diana de PKA o del sistema OXPHOS, se hicieron los mismos experimentos pero silenciando la proteína IF1. Así, pudimos ver que el silenciamiento de IF1 revertía el efecto de H89 en la OSR, apoyando que es IF1 defosforilado el que inhibe la actividad de síntesis de ATP del complejo V en células en cultivo (Fig. 24B).

Dado que una inhibición de la fosforilación oxidativa por IF1 tiene su efecto equilibrador en un aumento de la actividad de producción de ATP por vía de la glucólisis aeróbica (Formentini et al., 2014; Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Cenizo et al., 2010), lo siguiente fue determinar el flujo glucolítico mediante medida de la velocidad inicial de producción de lactato. El análisis de este parámetro reveló que la glucólisis aeróbica se encontraba aumentada en células tratadas con los inhibidores de PKA, mientras que la incubación con db-cAMP no afectaba a esta tasa de producción de lactato (Fig. 24C). El silenciamiento de IF1 previo al tratamiento con H89 y PKI mitigó hasta niveles similares a las células silenciadas sin tratar el flujo glucolítico (Fig. 24D). En resumen, con estos experimentos se demostró que la fosforilación de IF1 determina su actividad biológica y de esta manera la regulación por IF1 es un importante mediador en la reprogramación celular del metabolismo energético.

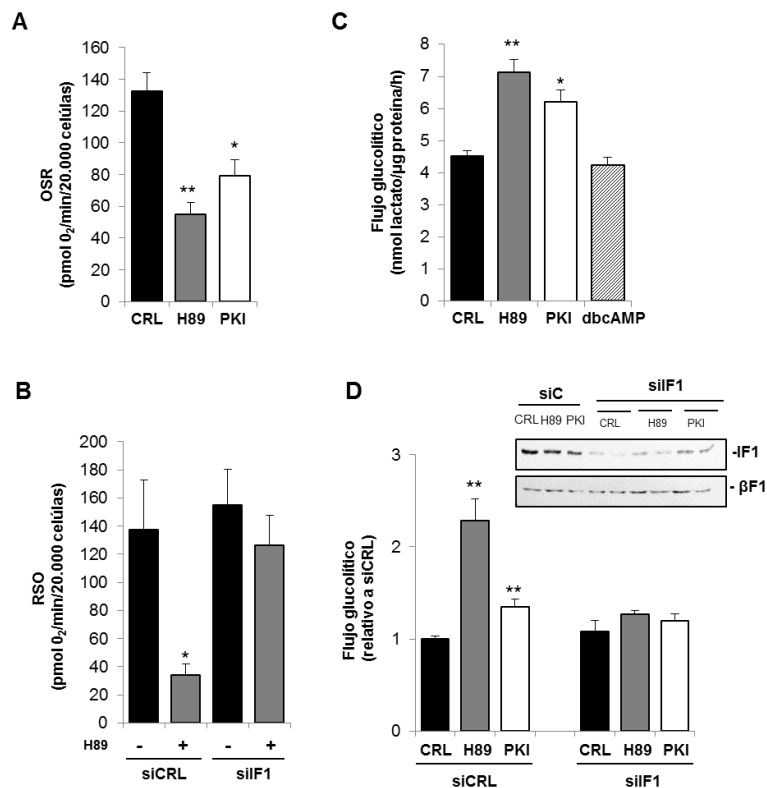


Figura 24. La defosforilación de IF1 reprograma el metabolismo energético. Células HCT116 fueron tratadas con H89 (gris oscuro), PKI (blanco), db-cAMP (gris claro) o dejadas sin tratar (CRL, negro). **A**, Histogramas mostrando la respiración sensible a oligomicina (OSR) de las distintas condiciones. **B**, OSR de células transfectadas con un siCRL o con el siRNA de siIF1 y tratadas (+) o no (-) con H89. **C-D**, Las tasas de producción de lactato fueron determinadas después de los tratamientos celulares indicados. En D, las células fueron transfectadas con el control (siCRL) o el siRNA de IF1 (siIF1) y tratadas como se indica. Se incluye la verificación del silenciamiento de IF1 por western blot. Los histogramas resultan de la media \pm SEM de tres experimentos distintos. * $p < 0.05$ cuando se compara con CRL por el test t de Student.

4.3. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE IF1.

4.3.1. Reprogramación metabólica por inhibidores.

Habiendo visto cómo el estado de fosforilación de IF1 afecta a la contribución relativa de dos de las vías metabólicas mayoritarias para la provisión de energía decidimos analizar el estado de fosforilación de IF1 comparando dos situaciones contrapuestas como son la inhibición de fosforilación oxidativa con oligomicina y de la glucólisis aeróbica por el análogo de la glucosa 2-desoxi-glucosa (2DG). El análisis de la fosforilación de IF1 en geles de 2D de células HCT116 crecidas durante 48 h en presencia de los dos compuestos mencionados reveló una diferencia entre ambas condiciones (Fig. 25). Por un lado, la incubación en HCT116 con OL producía la activación

de la glucólisis e inhibición de la OXPHOS y una defosforilación de una fracción relevante (~30%) de IF1, manteniéndose todo fosforilado cuando incubamos con 2DG, consistentemente con la activación de la OXPHOS (Fig. 25A). Los mismos experimentos en la línea de mama BT549, que poseen la mayor parte de IF1 en estado defosforilado basalmente, revelaron la situación opuesta, mostrando un desplazamiento de una fracción de IF1 (~30%) hacia un estado más fosforilado cuando las células crecían en presencia de 2DG (Fig. 25B). Consistentemente con esto, cambios en el estado de fosforilación de IF1 correlacionaron con un incremento en la actividad OXPHOS, como muestran las medidas de la OSR y la reducción de la glucólisis aeróbica (Fig. 25B).

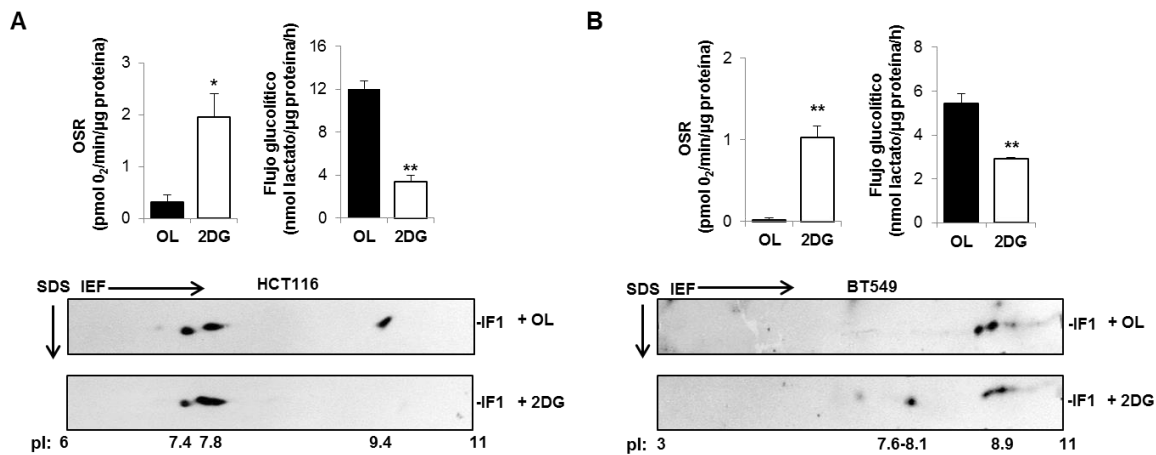


Figura 25. IF1 y las vías de provisión energética. Células HCT116 (A) o BT549 (B) fueron adaptadas durante 48 h mediante tratamientos con oligomicina (OL, negro) o 2-desoxi-glucosa (2DG, blanco). Se muestran la respiración sensible a oligomicina (OSR), la tasa de producción de lactato y el estado de fosforilación por geles 2D en ambos tipos celulares. El rango de pI se muestra debajo de los blots. Las barras en A y B indican la media \pm SEM de 8-10 muestras distintas. * $p < 0.05$ cuando se comparan por el test t de Student.

4.3.2. Reprogramación metabólica durante el ciclo celular.

Ya se ha visto anteriormente que la progresión por el ciclo celular tiene un impacto en la actividad relativa de los principales procesos de provisión energética de la célula (Chen and McKnight, 2007). Mientras que la fase G1 depende ampliamente de la fosforilación oxidativa, la fase reductora G2/M es estrictamente dependiente de la glucólisis aerobia e independiente del consumo de oxígeno. Por lo tanto, se decidió comparar los estados de fosforilación de IF1 en células HCT116 arrestadas en G1 por incubación con el inhibidor de DNA-polimerasa afidilcolina en contraposición al de las células arrestadas en G2/M por tratamiento con nocodazol, un disruptor del huso mitótico. El arresto en cada fase del ciclo fue determinado por citometría de flujo (Fig.

26A). Los resultados mostraron que la mayor parte de IF1 se encontraba fosforilado en células en G1 mientras que IF1 en su estado defosforilado estaba presente en las células arrestadas en G2/M (Fig. 26B). Consistentemente, los cambios en la fosforilación de IF1 correlacionaron con la actividad relativa tanto de OXPHOS como de glucólisis aerobia en las distintas fases del ciclo (Fig. 26C), coincidiendo IF1 defosforilado con una actividad OXPHOS reducida y un aumento en la glucólisis aerobia de las células.

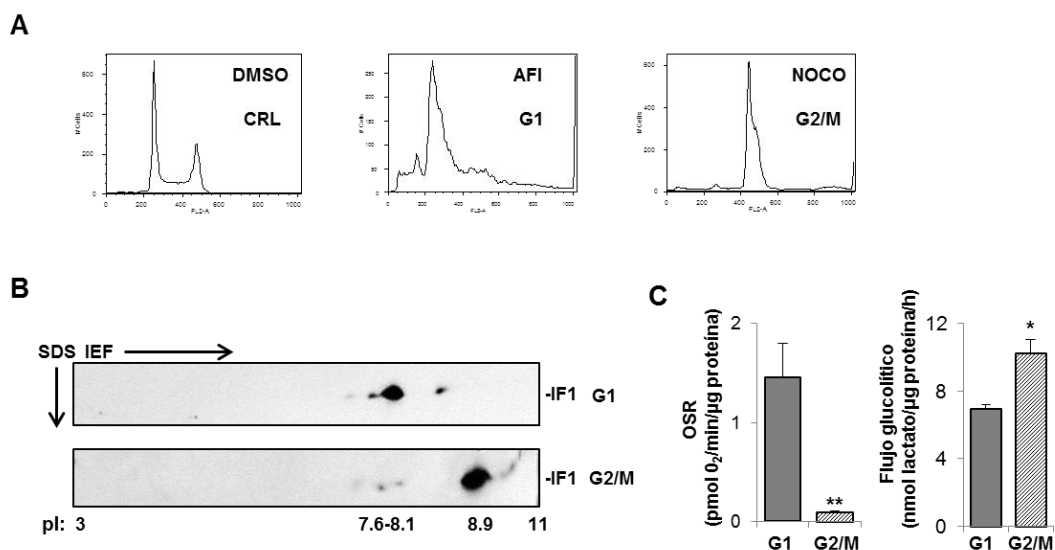


Figura 26. El estado de fosforilación de IF1 cambia con el ciclo celular. Células HCT116 fueron tratadas con afidicolina (AFI, G1, gris oscuro), nocodazol (NOCO, G2/M, gris claro) o con solo DMSO como control (DMSO, CRL). **A**, Determinación del estadio del ciclo celular de las células tratadas. **B**, Geles 2D de las células en estadio G1 y G2/M. **C**, Respiración sensible a oligomicina (OSR) y flujo glucolítico de las células en G1 y en G2/M. Las barras en C indican la media \pm SEM de 8-10 muestras distintas. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando se comparan por el test t de Student.

4.3.3.Reprogramación metabólica por hipoxia.

A pesar de no haber visto cambios en los niveles de IF1 a nivel de proteína, decidimos explorar si el estrés hipóxico producía un cambio en su estado de fosforilación y por lo tanto en su actividad. Se indujo hipoxia a células HCT116 bien por privación de oxígeno o químicamente incubando las células con CoCl_2 , que produce una acumulación del factor de hipoxia HIF-1 α y por lo tanto mimetiza la respuesta celular al estrés hipóxico. La hipoxia por ambos métodos promovió un arresto de la fosforilación oxidativa como indicó la disminución de la OSR y un aumento de la glucólisis aerobia (Fig. 27A). De nuevo consistentemente con la función inhibidora de IF1 defosforilado, observamos un cambio de IF1 hacia este estado de defosforilación en las células bajo

hipoxia (Fig. 27B). El efecto inhibitorio de IF1 defosforilado sobre las actividades ATP hidrolasa (Fig. 27C) y ATP sintasa (Fig. 27D) de la H^+ -ATP sintasa por hipoxia se confirmó en mitocondria aislada de células HCT116 y en células permeabilizadas, respectivamente. Además, se comprobó que la adición de un activador de la actividad de PKA como es la forskolina junto al $CoCl_2$ revertía parcialmente el efecto sobre las actividades hidrolasa y sintasa del enzima, mientras que la adición conjunta de $CoCl_2$ con H89 no generaba efectos significativos respecto al estrés hipóxico solo (Fig. 27C-D). Además, para confirmar que realmente IF1 en su forma defosforilada es el responsable del efecto sobre la H^+ -ATP sintasa observado en hipoxia, realizamos los mismos experimentos en células HCT116 en los que silenciamos transitoriamente IF1 (Fig. 27E), donde vimos que tras el silenciamiento los efectos del $CoCl_2$ sobre la actividad tanto hidrolasa como sintasa del enzima se revertían a niveles parecidos al siCRL sin tratar (Fig. 27E).

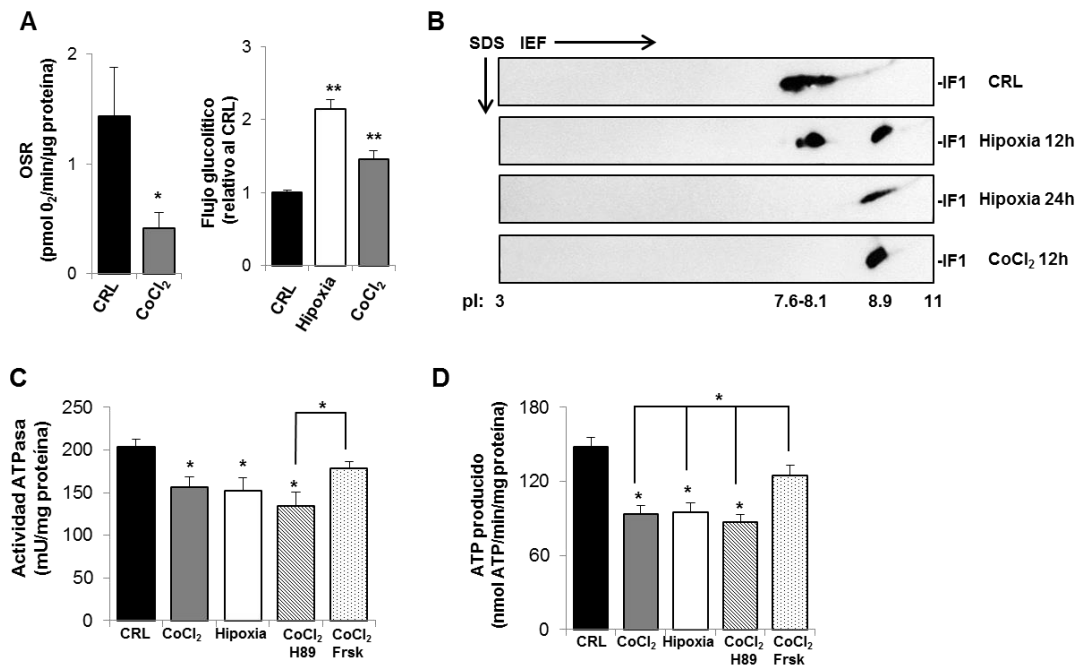


Figura 27. La hipoxia desencadena la defosforilación de IF1 y la inhibición de la ATP sintasa. Células HCT116 se dejaron sin tratar (CRL, negro), tratadas con $CoCl_2$ (gris) o sometidas a carencia de oxígeno (Hipoxia, blanco). El $CoCl_2$ también se añadió junto a H89 (rayado) o Frsk (punteado). Se incluyen la respiración sensible a oligomicina (OSR) y la velocidad inicial de producción de lactato (A) y el análisis del estado de fosforilación de IF1 por geles 2D (B). C, Actividad ATP hidrolasa de la H^+ -ATP sintasa determinado en mitocondria aislada. D, Tasa de producción de ATP en células HCT116 permeabilizadas previamente tratadas. Los histogramas en A, C y D representan la media \pm SEM de 3 experimentos distintos. ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ cuando se compara con las CRL por el test t de Student.

4.3.4.Reprogramación metabólica en cáncer.

Hemos descrito anteriormente la importante contribución de IF1 al fenotipo predominantemente glucolítico en algunos de los carcinomas humanos más prevalentes (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Cenizo et al., 2010). Para determinar el estado de fosforilación de IF1 y por lo tanto su actividad relativa en distintas muestras de tumores humanos utilizamos la técnica de Phosphate-affinity (Phos-tag) electroforesis con posterior análisis por western blot. Esta técnica discrimina la forma fosforilada de una proteína de la no-fosforilada por la menor movilidad electroforética de la primera. Como ilustración del funcionamiento de la técnica, y utilizado como control en los estudios que vienen a continuación, la separación de fosfo-IF1 (p-IF1) del IF1 no fosforilado (IF1) en células HCT116 se muestra en la figura 28A, donde se puede observar que la incubación de las muestras con la fosfatasa CiP elimina las diferencias en migración electroforética de IF1.

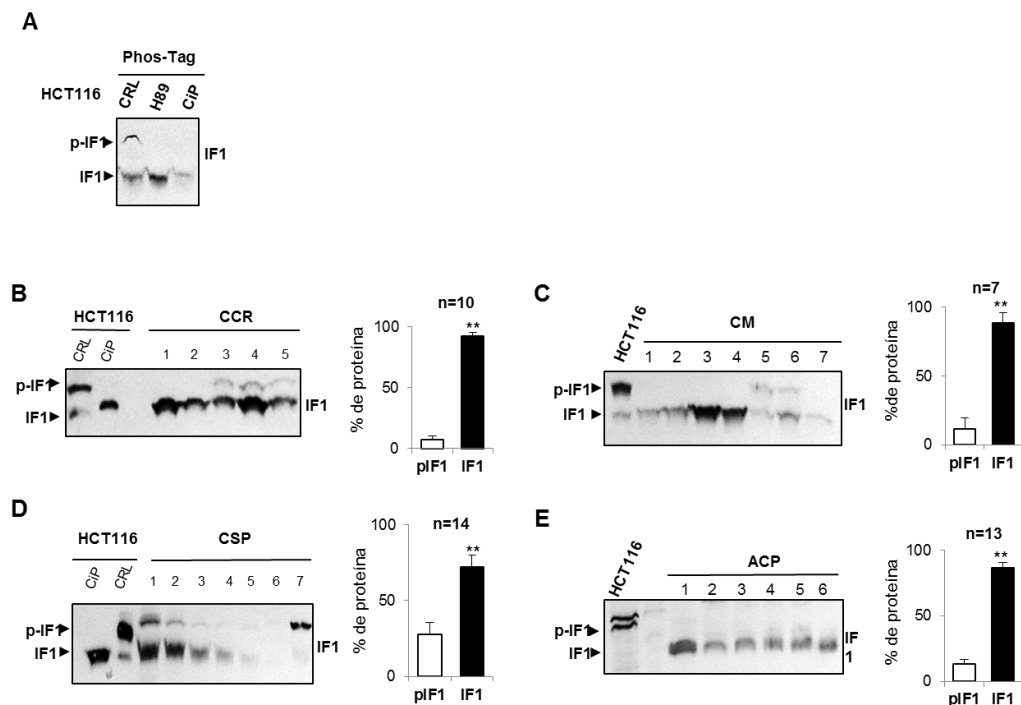


Figura 28. IF1 está defosforilado en carcinomas humanos. **A**, Determinación del estado de fosforilación de IF1 por Phos-Tag SDS-PAGE en muestras de HCT116 no tratadas (CRL) o tratadas con H89. Se incluye control de la técnica de muestra CRL defosforilada con fosfatasa CiP. **B-E**, Análisis del estado de fosforilación de IF1 por Phos-Tag SDS-PAGE de muestras tumorales humanas de pacientes de carcinoma colorectal (CCR, **B**), carcinoma de mama (CM, **C**), carcinoma escamoso de pulmón (CSP, **D**) y adenocarcinoma de pulmón (ACP, **E**). Se indica el número de pacientes analizados encima de los histogramas que representan el porcentaje de fosfo-IF1 (p-IF1, barras blancas) de IF1 defosforilado (IF1, barras negras) como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ cuando se comparan entre sí por el test t de Student.

El análisis de la inmunodetección usando Phos-Tag indicó que la gran mayoría de las muestras de: carcinoma colorectal (Fig. 28B), adenocarcinoma de mama (Fig. 28C), y carcinoma escamoso (Fig. 28D) o adenocarcinoma de pulmón (Fig. 28E) tienen IF1 en su estado defosforilado, enfatizando nuevamente el papel contributivo de IF1 como inhibidor de la H^+ -ATP sintasa y por lo tanto de la fosforilación oxidativa en estos carcinomas humanos.

4.3.5.Reprogramación metabólica *in vivo* por demanda energética.

La estimulación de β -adrenoreceptores cardiacos es un evento crucial en el incremento de la función cardiaca en situaciones de estrés (Steinberg and Brunton, 2001). Su acoplamiento a la estimulación de proteínas G heterotriméricas (Gs) desencadena la activación de adenilil ciclasas que generan el cAMP involucrado en la señalización mediante la activación de PKA. Para probar *in vivo* la relevancia de la fosforilación de IF1 inyectamos intraperitonealmente ratones con clenbuterol, un agonista β -adrenérgico. Como situación contrapuesta, otros ratones fueron tratados con propranolol, un antagonista β -adrenérgico. Se determinó el estado de fosforilación de IF1 (Fig. 29A) y la concentración intramitocondrial de cAMP (Fig. 29B) en paralelo con las actividades ATP hidrolasa (Fig. 29C) y sintasa (Fig. 29D) del enzima en mitocondria aislada de corazón de estos ratones. Pudimos observar que, interesantemente, ~50% de IF1 en el corazón de ratón está en estado fosforilado. La administración de clenbuterol promueve un incremento de IF1 fosforilado (ratones 1, 4, 5 in Fig. 29A), que a su vez se puede eliminar por incubación de extractos de estos corazones con la fosfatasa CiP (ratones 1, 4, 5 en Fig. 29A). Por el contrario, la administración de propranolol cambió el estado de fosforilación de IF1 hacia su estado defosforilado (ratón 3 en Fig. 29A). La inducción de PKA coincide con un aumento de cAMP en las mitocondrias de corazón de los animales tratados con clenbuterol (Fig. 29B). Consistente con la fosforilación de IF1 observamos que, en mitocondria aislada de corazón de ratones inyectados con clenbuterol, tanto la actividad ATP hidrolítica (Fig. 29C) como ATP sintética (Fig. 29D) de la H^+ -ATP sintasa eran significativamente mayores que las de las mitocondrias aisladas de ratones control. De acuerdo con esto, la defosforilación de IF1 observada después de la administración de propranolol también correlacionaba con ambas actividades del complejo V significativamente reducidos cuando comparábamos con los controles inyectados con suero

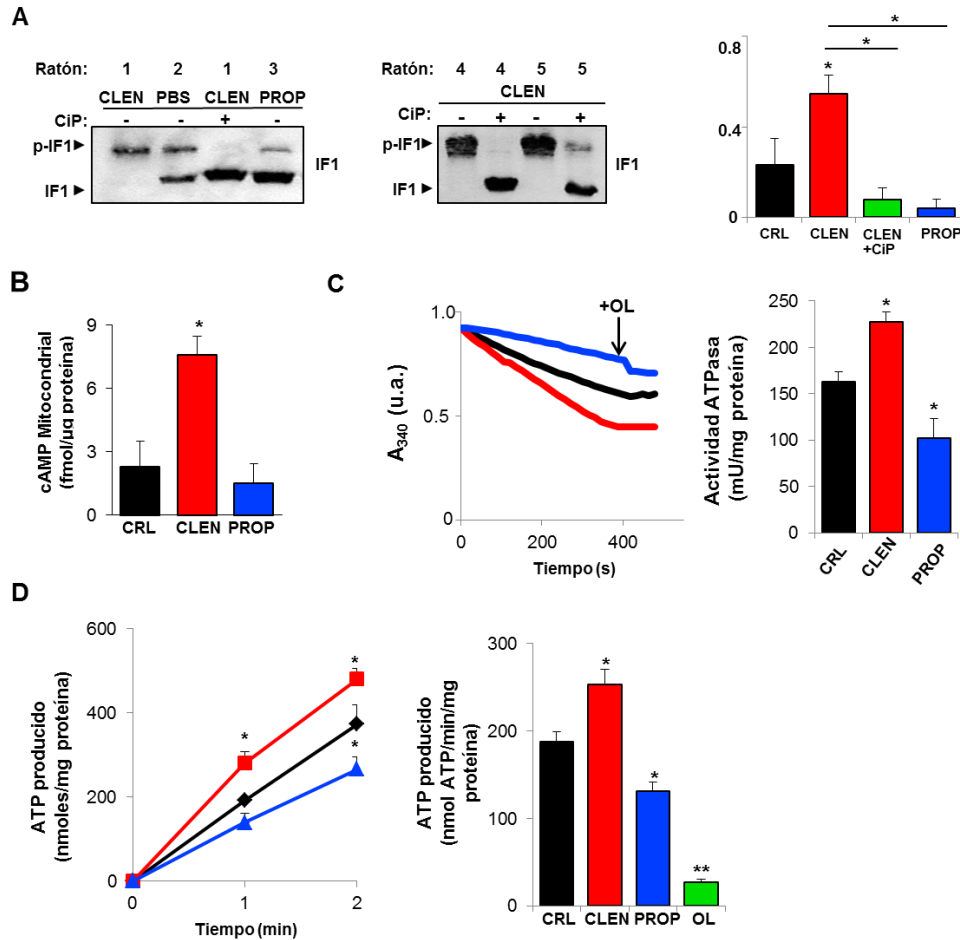


Figura 29. La estimulación in vivo de PKA promueve la fosforilación de IF1 y su inactivación como inhibidor. Ratones fueron inyectados intraperitonealmente con PBS (CRL, negro), 1 mg/kg de clenbuterol (CLEN, rojo) o 10 mg/kg de propranolol (PROP, azul). **A**, Phos-Tag SDS-PAGE para el análisis del estado de fosforilación de IF1 en muestras de corazón de ratón. Tratamiento con CiP de las muestras de ratones CLEN (verde) se incluyen como control. Se muestra el ratio pIF1/IF1 total para todos los tipos de muestras. **B**, Niveles de cAMP en mitocondria aislada de corazón de ratones. **C**, Actividad hidrolasa de la H^+ -ATP sintasa en mitocondria aislada de corazón de ratón. Donde se indica, se añadió 30 μ M de oligomicina (OL). **D**, Producción de ATP en mitocondria aislada de corazón. Las barras representan la media \pm SEM de cuatro ratones distintos por condición. * $p < 0.05$ cuando se compara con los ratones CRL por el test t de Student.

Debido a la existencia de dos tipos de adenilato ciclasa (soluble: sAC; transmembrana: tmAC), cada una de ellas activada en respuesta a distintos estímulos, quisimos saber si la sAC, que puede encontrarse dentro de la mitocondria (Acin-Perez et al., 2009) era una buena candidata a promover la señal que fosforila a IF1. Se analizó por geles en 2D el estado de fosforilación de células HCT116 cultivadas en un medio común (CRL), en un medio privado de calcio y de bicarbonato y en este mismo medio pero con adición de Ca^{2+} y HCO_3^- a concentraciones fisiológicas (Fig. 30A). Lo que pudimos ver es el gran contraste entre el estado totalmente fosforilado de las células control frente a la defosforilación completa de las células sin calcio ni

bicarbonato. La adición exógena de ambos compuestos, sin embargo, resultó en la fosforilación de una fracción de la proteína pero no de todo el IF1 celular (Fig. 30A). Dado el interés de que la fosforilación de IF1 pudiera ser intramitocondrial y de que la adición de estímulos de la sAC de manera exógena en el medio celular no produjo la total fosforilación de IF1, profundizamos en que una PKA mitocondrial estuviera fosforilando a IF1 de manera local: se aislaron mitocondrias de células HCT116 tratadas con H89 para que presentaran IF1 en estado mayoritariamente fosforilado y se les añadió de manera exógena db-cAMP, que es permeable a la membrana mitocondrial, durante un tiempo corto de incubación para luego analizar el estado de fosforilación de IF1 por geles 2D (Fig. 30B). El resultado fue que la adición del estímulo de cAMP a mitocondrias aisladas producía una rápida y total fosforilación de IF1 confirmando que hay una quinasa de respuesta a cAMP en la mitocondria y que ésta es la responsable directa de la modificación de IF1 (Fig. 30B). Esta fosforilación ocurrió en presencia y en ausencia de inhibidores de fosfatasa permeables (Fig. 30B) lo que descartaba que una PKA mitocondrial pudiera estar afectando a la actividad de una fosfatasa y que esto fuera indirectamente el evento responsable de que IF1 se fosforilara al activar PKA.

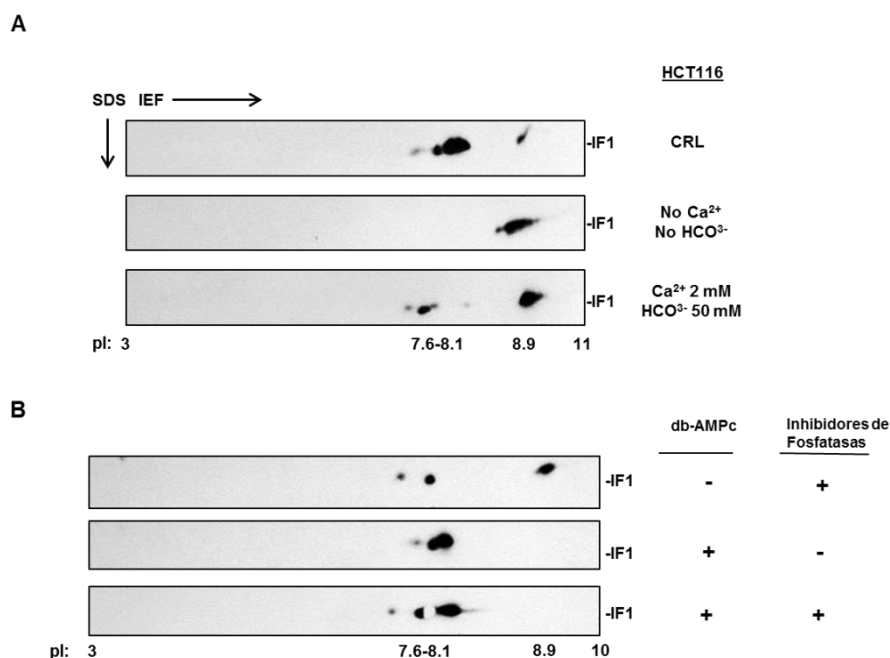


Figura 30. La fosforilación de IF1 por PKA es intramitocondrial. **A**, Células HCT116 fueron incubadas en medio completo (CRL) o en medio sin Ca^{2+} ni HCO_3^- durante 12h y el estado de fosforilación de IF1 determinado por electroforesis bidimensional. Se incluye el análisis 2D de IF1 para células en medio sin Ca^{2+} y HCO_3^- que fueron posteriormente suplementadas con ambos a concentraciones fisiológicas. **B**, Mitocondrias aisladas de células HCT116 tratadas con H89 se incubaron a 37°C durante 10 min en presencia (+) o ausencia (-) de db-cAMP e inhibidores de fosfatasa para posteriormente analizar el estado de fosforilación de IF1.

4.3.6. IF1 defosforilado es más estable que el IF1 fosforilado.

A pesar de no haber visto cambios en los niveles estacionarios de proteína IF1 en tratamientos cortos de inhibidores de PKA como H89, quisimos saber si, aparte de determinar la actividad de la proteína, el estado de fosforilación también podía influir en la vida media de la proteína. Tras un marcaje radioactivo con Met-S³⁵ de células HCT116 bien no tratadas (-) o tratadas (+) con H89 y consecuentemente con IF1 defosforilado, se inmunoprecipitaron: IF1, la proteína citoplasmática glucolítica GAPDH y la proteína mitocondrial estructural Hsp60. Lo que pudimos ver es que, ante la ausencia de cambios significativos en la vida media de Hsp60, IF1 defosforilado (H89) presentaba una mayor estabilidad y a 6 h sus niveles aparecían prácticamente invariables (Fig. 31A; $t_{1/2} = 15$ h). En las células sin tratar, sin embargo, la vida media de IF1 correspondía a una cercana a las 5 h, acorde a los datos anteriores (Fig. 14). Cabe destacar que, de acuerdo con resultados anteriores del laboratorio en los que la activación de una vía metabólica promueve una mayor tasa de recambio de las proteínas de la misma (Martinez-Reyes, 2012), las células tratadas con H89 (y con mayor tasa de glucolisis aerobia, ver Fig. 24) presentan una tasa de recambio mucho más elevada de la glucolítica GAPDH (Fig. 31A).

Debemos destacar que ni el tratamiento con Ant A a tiempo corto ni el apantallamiento de los ROSmt produce cambios significativos en el estado de fosforilación de IF1 (Fig. 31B).

Para profundizar en la degradación de IF1 en ambos estados de fosforilación se decidió utilizar un protocolo de aislamiento de mitocondrias y posterior incubación en un medio respiratorio a 37°C para determinar de manera específica la degradación mitocondrial aislada de procesos de traducción e importe de proteínas. Se confirmó de nuevo pero en mitocondrias aisladas de cerebro de ratón que IF1 se degradaba a tiempos cortos de 6 h y que esta degradación dependía de metalo-(o-phe) y serín-proteasas (AEBSF) (Fig. 31C), lo que sirvió como puesta a punto del método de análisis de degradación intramitocondrial. En el siguiente paso se aislaron mitocondrias de células HCT116 con IF1 defosforilado o bien fosforilado y se incubaron durante 6 h a 37°C. El análisis por western blot demostró que IF1 defosforilado se mantiene estable tras 6 h de incubación mientras que IF1 fosforilado se degrada más rápido (Fig. 31D). De hecho, la fosforilación de IF1 añadiendo db-cAMP exógeno a las mitocondrias con IF1 defosforilado (tal y como se demostró en Fig. 30) aumentó su degradación con respecto a las no tratadas con el compuesto (Fig. 31D), confirmando que el estado de fosforilación es vital en la estabilidad y envío a degradación de IF1.

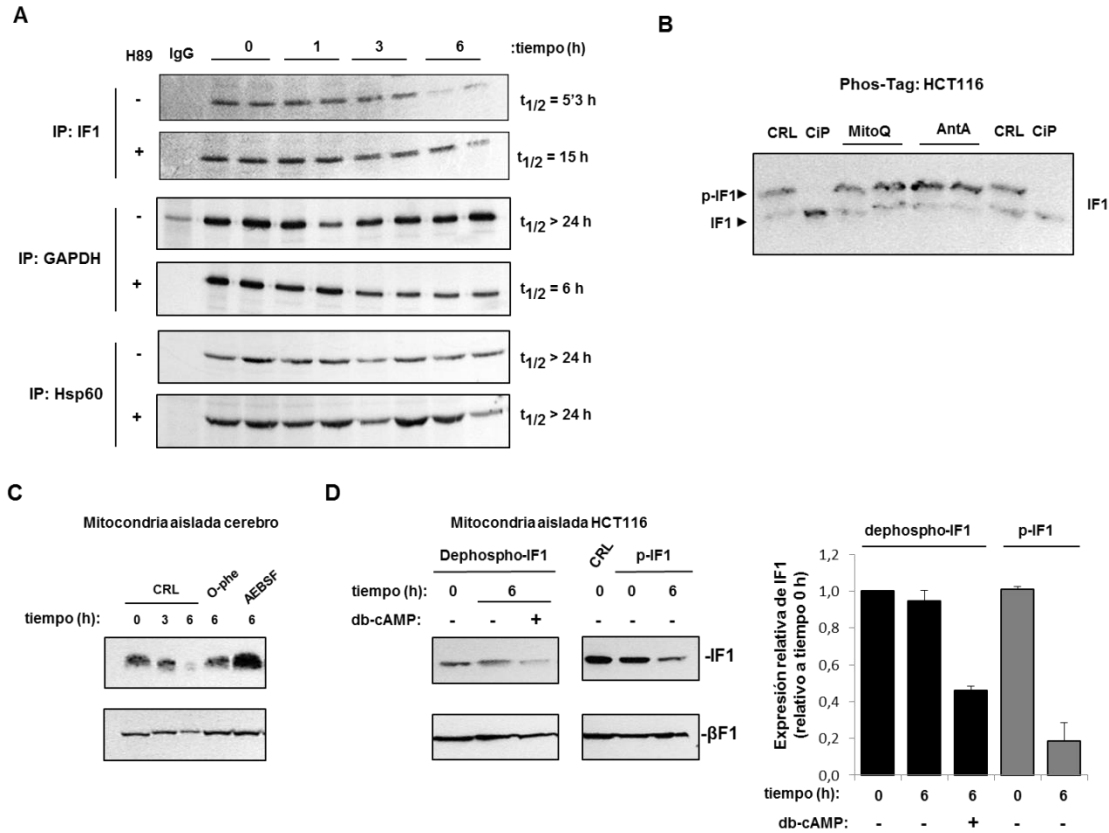


Figura 31. IF1 defosforilado es más estable que el IF1 fosforilado. **A**, Células HCT116 fueron incubadas (+) o no (-) con H89 tras lo que se marcaron con Metionina- S^{35} y se recogieron las células a los tiempos indicados. Se inmunoprecipitaron IF1, GAPDH y Hsp60 y se analizó por fluorografía el contenido en proteína marcada y las diferencias en la cinética de decaimiento y vida media en IF1 y la glucolítica GAPDH. Se incluyen en el cálculo de la vida media muestras de 3 experimentos distintos. **B**, Phos-Tag SDS-PAGE de células HCT116 previamente tratadas durante 4 h con MitoQ o Ant A. Se incluyen dos controles de tratamiento con CiP sobre células no tratadas (CRL). **C**, Western blot de IF1 y β F1 de mitocondrias aisladas de cerebro de ratón incubadas a 37°C durante los tiempos indicados en ausencia (CRL) o presencia de los compuestos o-fenantrolina (O-phe) y AEBSF. **D**, Western blot de IF1 y β F1 de mitocondrias aisladas de células HCT116 con IF1 defosforilado (Dephospho-IF1) o fosforilado (p-IF1) e incubadas a 37°C durante los tiempos indicados y en presencia (+) o ausencia (-) de db-cAMP en el medio de incubación de las mitocondrias. Los histogramas representan la media \pm SEM de dos muestras por condición.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Regulación de la expresión de IF1.

A pesar de la importancia de IF1 en procesos centrales como la reprogramación del metabolismo energético (Sanchez-Cenizo et al., 2010), el cáncer (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a), la diferenciación celular (Sanchez-Arago et al., 2013b) o incluso la patología de la CTE (Chen et al., 2014), muy pocos estudios han aportado luz sobre la potencial regulación de los niveles o de la actividad de este inhibidor de la H^+ -ATP sintasa.

El estudio *in silico* del promotor revela la existencia de algunos factores de transcripción potencialmente interesantes que se unen a la región promotora del gen *ATPIF1* (Sanchez-Arago et al., 2013a): destacan el oncogén c-Myc o los factores c-Fos y NF κ B pertenecientes a vías de señalización activadas por la sobreexpresión de IF1 en células de colon (Formentini et al., 2012) o en cerebro de ratón transgénico tras provocar una lesión con ácido quinolínico (Formentini et al., 2014). Esta unión de factores que a su vez se activan por la señalización por ROS de IF1 podría indicar un fenómeno de retroalimentación de la vía de señalización. Otro dato de interés que surge del estudio del gen *ATPIF1* es la presencia en el intrón 2 de una secuencia de muy alta conservación filogenética: esto indica un potencial sitio de regulación de la traducción del mRNA en esta zona no codificante.

La mayor parte de los estudios sobre IF1 se han centrado en su papel en la situación hipóxica o de isquemia cardiaca (Campanella et al., 2008; Rouslin and Broge, 1990, 1996). La acidificación de la matriz mitocondrial que produce la ausencia de O_2 disponible se ha propuesto como estímulo para promover la dimerización y activación de la inhibición de IF1 sobre la actividad hidrolasa de la ATP sintasa (Cabezon et al., 2000b). Además de esta posible activación de la actividad de IF1 se había descrito que la hipoxia y en concreto los niveles de HIF-1 α se correlacionaban con los niveles del mRNA de IF1 (Huang et al., 2011). Experimentos con el promotor del gen *ATPIF1* acoplado a la expresión de luciferasa indicaron que, a tiempos cortos de tratamiento (4-8 h), un inductor químico de hipoxia como es el $CoCl_2$ produce un aumento de la tasa de transcripción del gen. Sin embargo, el tratamiento de las células con el inhibidor de proil-hidroxilasas DMOG, que genera una acumulación de los niveles de HIF-1 α , no produjo el mismo efecto por lo que se pone en duda que fueran los niveles directos de esta subunidad del factor inducible por hipoxia lo que genera una mayor transcripción de este gen. En un contexto más fisiológico, como es en distintas líneas celulares tumorales y midiendo los niveles proteicos de IF1, tratamos las células durante 6 h con $CoCl_2$ y, aún viendo acumulación de HIF-1 α , esto no produjo un aumento de los niveles de IF1 (Sanchez-Arago et al., 2013a) por lo que descartamos que en este

contexto celular la regulación por hipoxia tenga un efecto directo sobre los niveles de proteína de IF1.

Debido a la importancia de la reprogramación metabólica en cáncer y al alto grado de acumulación de IF1 que vimos en las muestras humanas de carcinomas más prevalentes decidimos centrar el estudio de los niveles de mRNA en esta situación. Los estudios de PCR cuantitativa en cohortes de pacientes de tumores de colon, pulmón, mama y ovario demostraron que la acumulación de IF1 se da por mecanismos independientes de la transcripción. En una primera aproximación también quisimos determinar la importancia relativa de cada una de las tres isoformas descritas de IF1. Que el splicing alternativo generara isoformas específicas de tejido (Heinzen et al., 2008) e incluso que en patologías como en cáncer se acumulara alguna isoforma específica nos pareció una opción interesante de estudiar. Asimismo, existen casos de isoformas proteicas más cortas pero estables que actúan como dominante negativo de las isoformas largas como es el caso de la proteína Fox (Damianov and Black, 2010), lo que dada la capacidad de oligomerización de IF1 podía generar una posibilidad de regulación. Es de destacar que el estudio de las isoformas revela la gran prevalencia de la isoforma proteica larga, la isoforma 1, a nivel de mRNA y de proteína. Además, los experimentos de RT-qPCR destacan la ausencia de diferencias tejido específicas o en la situación tumoral, poniendo de manifiesto que las isoformas 2 y 3 de IF1 no tienen un papel relevante en las situaciones estudiadas.

Visto que, al menos en cáncer, la regulación transcripcional del gen *ATP1F1* no tiene la relevancia esperada, el siguiente paso fue centrarse en mecanismos de regulación post-transcripcional. Dado que se había descrito que la proteína humana IER3 se implicaba en la estabilidad de IF1 decidimos comprobar si esto ocurría también en el contexto tumoral. IER3 ha sido previamente implicado en el proceso carcinogénico básicamente como inductor de apoptosis y supresor de tumores (Sebens Muerkoster et al., 2008) pero también en otros contextos como inductor de Kras y oncogénico (Garcia et al., 2014) lo que pone de manifiesto su papel en la activación de diferentes vías de señalización (Wu, 2003). El análisis del contenido relativo a muestras no tumorales de IER3 en muestras tumorales humanas en las que se había comprobado la acumulación de IF1 indicó que no solo no había una relación inversa entre los niveles de expresión de uno y otro, sino que incluso ambos se acumulaban claramente en muestras tumorales de colon, pulmón y mama ((Sanchez-Arago et al., 2013a). Estos resultados fueron confirmados con el silenciamiento parcial de IER3 y la ausencia de cambios en los niveles de IF1 (Sanchez-Arago et al., 2013a). Todo indica que, aunque se ha propuesto que la interacción directa de IER3 e IF1 juega un papel en el enmascaramiento de la secuencia para la unión con otras proteínas implicadas en su

degradación, en el proceso de acumulación de IF1 en carcinomas no nos parece que sea el único factor implicado.

La degradación de IF1 parecía que iba a depender de diversos factores dada la importancia de la acumulación de la proteína, y dicha importancia quedó de manifiesto cuando el cálculo de la vida media o velocidad de degradación de IF1 por ensayos de pulso y caza resultó en una vida media corta ($t_{1/2} \sim 2-4$ h) (Sanchez-Arago et al., 2013a) cuando comparamos con otras proteínas mitocondriales como Hsp60 ($t_{1/2} \sim 24$ h) o β -F1-ATPasa (Martínez-Reyes, 2012). Ahondando en el proceso de degradación quisimos saber cuál era la maquinaria celular implicada y en primer lugar se demostró que el proteasoma citosólico no estaba implicado de manera directa ni indirecta, lógico si tenemos en cuenta que su función principal en mitocondria es la de degradar proteínas de la membrana externa mitocondrial (Karbowski and Youle, 2011).

En la matriz y membrana interna mitocondriales hay una serie de proteasas mitocondriales candidatas a degradar a IF1. La incubación con el inhibidor de serín-proteasas AEBSF y subsiguiente acumulación de IF1 a tiempos cortos son consecuentes con la $t_{1/2}$ calculada. Nos centramos en las tres serín-proteasas mitocondriales: Lon y ClpXP en la matriz y la de espacio intermembrana Htra2; en la peptidasa PMPCB y en tres metaloproteasas de membrana interna, Spg7, AFG3L2 y YME1L. El silenciamiento parcial en células HCT116 de cada una de ellas resultó en la ausencia de cambios en los niveles de IF1 a pesar de tasas de silenciamiento superiores al 50% (Sanchez-Arago et al., 2013b), determinado éste por los niveles de mRNA o de proteína. Para profundizar en esto nos propusimos inhibir químicamente otro grupo de proteasas mitocondriales, las metaloproteasas, mediante incubación con el compuesto o-fenantrolina viendo de nuevo que la incubación con el compuesto acumulaba IF1 a tiempos cortos y esta vez haciéndolo sobre una fracción enriquecida en mitocondria mediante tratamiento con digitonina de los extractos celulares. El estudio sobre la degradación de IF1 de (Shen et al., 2009) indicaba la dependencia de ATP dentro de la mitocondria para la degradación de IF1 por lo que una metaloproteasa candidata era YME1L, situada en la membrana interna mitocondrial con su sitio proteolítico hacia el espacio intermembrana y dependiendo de ATP y de Zn^{2+} para su funcionamiento. Los experimentos de silenciamiento transitorio en HCT116 y sobre un extracto enriquecido en mitocondria indicaron que YME1L se implicaba en el proceso de degradación de IF1. El análisis de los niveles de IF1 en una línea de neuroblastoma en donde la expresión de YME1L está interrumpida de manera estable (Rainbolt et al., 2015) reveló la acumulación de IF1 con respecto a las células control, aunque no en el 100% de los casos analizados lo cual indica la posible presencia de funciones solapantes entre varias proteasas mitocondriales para la degradación de IF1 y/o de la necesidad de un estímulo o señal para su envío a degradación.

De hecho, hemos visto cómo la fosforilación define la $t_{1/2}$ de la proteína. Esta diferencia en vida media podría deberse a una menor degradación por un posible cambio conformacional o a su mayor asociación con la H^+ -ATP sintasa evitando así la interacción y disponibilidad para las proteasas mitocondriales. En este sentido, las líneas celulares con IF1 en estado basal defosforilado (BT549 y HOP62) no tienen respuesta a AEBSF mientras que las que tienen IF1 fosforilado (HCT116 y OVCAR8) sí que acumulan la proteína en respuesta al compuesto. La diferente sensibilidad de IF1 a la hora de ser degradado por proteasas mitocondriales también podría ser fruto del hecho de que IF1 en su forma no unida a la H^+ -ATP sintasa parece encontrarse en una estructura intrínsecamente desordenada en su extremo más largo C-terminal (Gordon-Smith et al., 2001) y cuando se ordena es cuando se une a la ATP sintasa y la inhibe (Bason et al., 2014). Hay estudios que sugieren que la estructura desordenada intrínseca de un péptido afecta a la vida media de la proteína (Hegyi and Tompa, 2008) especialmente cuando hablamos del sistema del proteasoma (van der Lee et al., 2014). Esta presencia de una proteína desordenada podría servir como señal de unión a chaperonas y envío a degradación de la misma por distintas vías de control de calidad como serían las serín-proteasas y las metaloproteasas, explicando también la corta vida media de IF1.

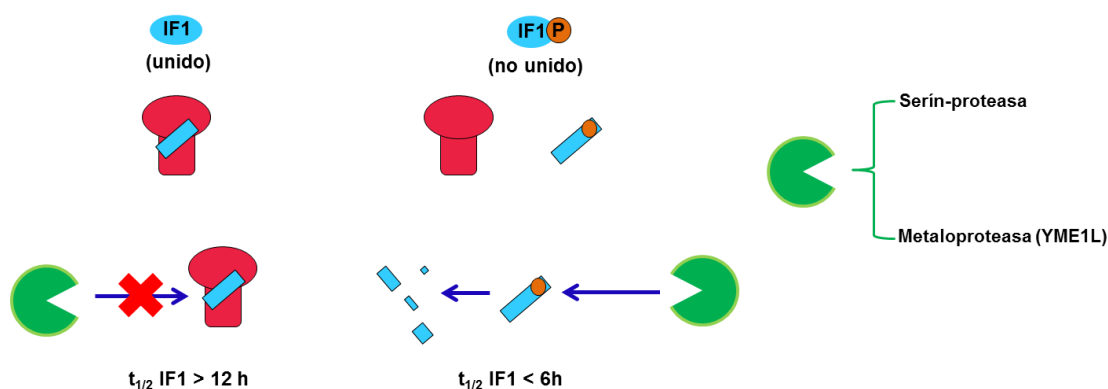


Figura 32. La fosforilación de IF1 define su degradación. IF1 (esfera y bastón azul) fosforilado (esfera naranja) o no, de lo cual depende su unión a la H^+ -ATP sintasa (esfera y rectángulo rojo). Cuando está defosforilado se une al complejo y no puede ser fácilmente degradado por una proteasa mitocondrial (verde) por lo que posee una vida media superior a 12 h y similar a la de la H^+ -ATP sintasa. Fosforilado se encuentra libre en la mitocondria, degradándose por proteasas mitocondriales en una ventana de tiempo de menos de 6 h. Las proteasas mitocondriales propuestas por este estudio son las serín-proteasas y la metaloproteasa YME1L.

La mitocondria produce ROS como molécula señalizadora con diversas funciones (Martinez-Reyes and Cuezva, 2014) habiendo nuestro grupo descrito que la sobreexpresión de IF1 produce una señal leve de ROS (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a). La inhibición del complejo III de la CTE por medio de antimicina A es una situación crítica para la viabilidad celular salvo cuando hay una pérdida de expresión de IF1 (Chen et al., 2014). Cuando decidimos ahondar en la relación de IF1 y los ROS vimos que el tratamiento con antimicina A

producía una disminución progresiva de los niveles de IF1 con el tiempo llegando incluso a desaparecer a 12 h, todo ello sin afectar a los niveles de las proteínas mitocondriales y citosólicas estudiadas. Dado que un periodo de estrés por antimicina A a las 12 h es una ventana de tiempo que puede llegar a generar mitofagia, se eligió 6 h como tiempo de estudio para el tratamiento con antimicina A. El tratamiento conjunto de antimicina A con el apantallador de ROS de origen mitocondrial MitoQ demostró que el efecto de disminución de los niveles de IF1 dependía de estos ROSmt. Los ROSmt se relacionan con la oxidación (Jung et al., 2013) y la ubiquitinación (Medicherla and Goldberg, 2008; Wilkie-Grantham et al., 2013) asociadas a degradación proteica por lo que se comprobó que IF1 en condiciones de tratamiento con antimicina A no estaba ni oxidado ni ubiquitinado. Los ensayos de marcaje radioactivo y análisis de la velocidad inicial de traducción de IF1 en condiciones control y tratadas 6 h con antimicina A demostraron que los ROSmt actúan sobre IF1 de manera selectiva y a nivel de la inhibición de su traducción. El mecanismo molecular por el que los ROS puedan estar enmascarando la traducción de IF1 no ha sido resuelto en esta tesis y merecería una investigación más profunda: no obstante no existen muchos estudios que reporten la inhibición de la traducción por ROS salvo relacionado con acumulación de HIF-1 α (Pan et al., 2007), el cual hemos demostrado que no afecta a los niveles estacionarios de IF1. Sin embargo, la función crítica de los ROSmt como intermediarios de gran cantidad de rutas de señalización (Hamanaka and Chandel, 2010) hace que los potenciales efectores de esta inhibición puedan ser muchos, especialmente por afectar a factores de transcripción que controlen proteínas o miRNAs que potencialmente regulen los niveles de IF1. La disminución de los niveles de IF1 ante malfuncionamiento de la CTE sería una estrategia más de la célula para poder mantener el potencial de membrana y así mantener su viabilidad ante un estrés suave que no acabe en mitofagia (Chen et al., 2014; Lefebvre et al., 2013).

Al tratarse de una proteína de vida media corta el control traduccional de IF1 adquiere una mayor importancia como se ha visto en la inhibición desencadenada por ROSmt. Es por esto que la el estudio de mecanismos de regulación traduccional para IF1 son especialmente importantes. La proteína de unión a RNA LRPPRC (o LRP130) está altamente conservada en metazoos y posee una secuencia de localización mitocondrial (Sterky et al., 2010). La funcionalidad de esta proteína quedó subrayada con el descubrimiento de que mutaciones en el gen *LRPPRC* causan la variante Franco-Canadiense del síndrome de Leigh, un desorden metabólico caracterizado por deficiencia en actividad citocromo c oxidasa (Mootha et al., 2003b). Posteriormente se ha confirmado la importancia de LRP130 en la regulación de la expresión de prácticamente todos los mRNAs codificados por el mtDNA (Gohil et al., 2010) y todo ello sin afectar a la tasa de transcripción en la mitocondria (Harmel et al., 2013). Aunque los estudios de silenciamiento en líneas celulares

sugieren que su función principal es puramente intramitocondrial y relacionada con el control de la estabilidad de los mRNAs mitocondriales (Sasarman et al., 2010; Sterky et al., 2010), hay evidencias de que LRP130 a pesar de su enriquecimiento en mitocondria también se puede encontrar en la membrana externa nuclear o incluso en el retículo endoplásmico (Tsuchiya et al., 2004) uniendo *in vivo* mRNAs nucleares (Mili and Pinol-Roma, 2003). El estudio *in vivo* en animales transgénicos que carecen de LRP130 indica que la proteína posee funciones más allá de la estabilidad del mRNA y que se relaciona con la poliadenilación de mRNAs mitocondriales y con la coordinación en la traducción mediante un ribonucleocomplejo asociado a la proteína SLIRP (Lagouge et al., 2015; Ruzzenente et al., 2012), ocurriendo lo mismo con su homólogo en *D. melanogaster* (Baggio et al., 2014; Bratic et al., 2011). El estudio en ratón condicional para corazón que no expresa LRP130 (Mourier et al., 2014) demuestra una producción de ATP disminuida en los animales transgénicos y todo ello asociado a deficiencias en el ensamblaje de la H⁺-ATP sintasa y a una incapacidad de translocar protones así como mayor producción de ROS. Estos efectos se ven acompañados de una acumulación clara de IF1 y todo en ausencia de cambios en los niveles de su mRNA. En nuestros ensayos RIP vimos que LRPPRC interacciona con el mRNA de IF1 a niveles comparables a los del mRNA de COXI que se usa de control positivo (Xu et al., 2012). Si esta interacción ocurre también *in vivo* o si tiene algún efecto sobre la tasa de traducción de IF1 quedan como interrogantes para futuros estudios y, aunque su función parece centrarse en mRNAs mitocondriales, el grupo de Spiegelman ha descrito que LRP130 forma parte de un complejo con PGC1- α y puede afectar a genes nucleares relacionados con el metabolismo energético como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa o la glucosa-6-fosfatasa (Cooper et al., 2006) o incluso de la proteína desacoplante 1 (UCP1) (Cooper et al., 2008). Queda por ver si una posible interacción fuera de la mitocondria del mRNA de IF1 con LRPPRC tiene algún papel en su traducción o si la desregulación producida por el KO de LRP130 en corazón (Mourier et al., 2014) afecta a alguna proteína que a su vez produce la acumulación de IF1.

El análisis de los microRNAs con un apareamiento potencial con el 3'UTR de IF1 reveló que el miRNA-24-3p era el que tenía un efecto regulador más fuerte sobre los niveles de IF1. A pesar de la sorpresa inicial ya que su apareamiento óptimo es con una región del mRNA de IF1 que sólo está en la isoforma 2, el análisis de nuevo de la secuencia 3'UTR de la isoforma 1 de IF1 teniendo en cuenta el algoritmo de probabilidad de interacción por accesibilidad de diana (PITA por las siglas en inglés de Probability of Interaction by Target Accessibility) (Kertesz et al., 2007) reveló una secuencia en este 3'UTR de apareamiento no canónico sin cebador pero con afinidad y probabilidad de acción. Los experimentos con el gen reportero de luciferasa clonado con el 3'UTR de IF1 confirmaron la disminución de la actividad luciferasa cuando se transfectaba con el pre-miR-

24-3p y que esta disminución se revertía cuando mutábamos 3 nucleótidos de la secuencia de apareamiento del 3'UTR con el miR-24-3p.

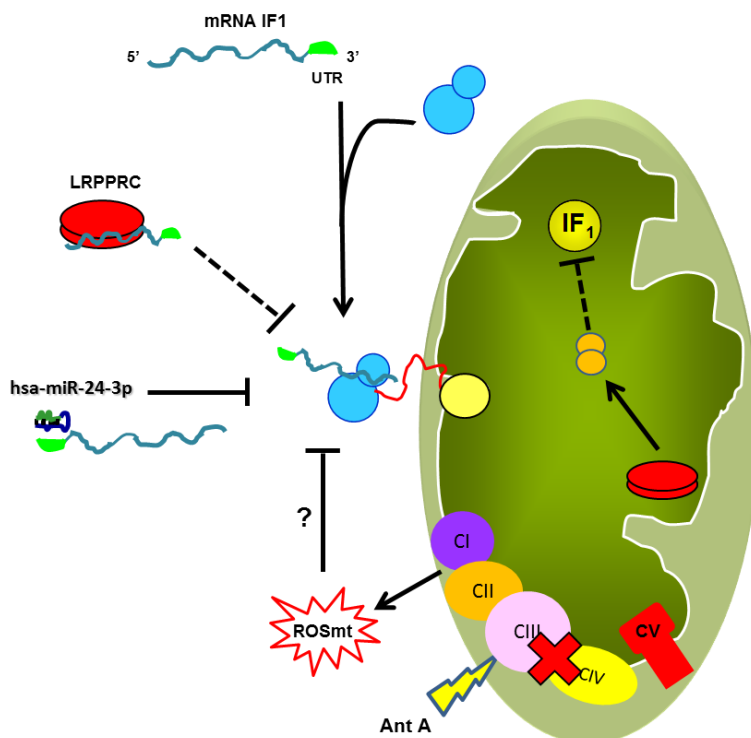


Figura 33. Regulación de la expresión de IF1. En ausencia de cambios en el mRNA, el diagrama muestra mecanismos que controlan la expresión de IF1 (esfera amarilla). El mRNA de IF1 (verde oscuro) se asocia al ribosoma (azul) para su traducción e importe de IF1 a la mitocondria. Sin embargo, la proteína LRPPRC (rojo) afecta negativamente a los niveles de IF1 por una posible inhibición de la traducción pendiente de demostrar (flecha discontinua) o por un efecto sobre otras proteínas mitocondriales que a su vez inhiben la expresión de IF1. En segundo lugar, el microRNA hsa-miR-24-3p aparea con el 3'UTR del mRNA de IF1 (verde claro) e inhibe la traducción de éste. Por último, el bloqueo específico del complejo III (CIII, rosa) con antimicina A (Ant A) produce ROS de origen mitocondrial (ROSmt) que por un mecanismo por determinar inhiben la traducción del mRNA de IF1 de manera selectiva.

Un análisis del array de expresión de distintos genes a nivel de mRNA en condiciones de sobreexpresión de miR-24-3p demostró la importancia del apareamiento sin secuencia cebadora de miR-24 en la regulación de la expresión de distintos genes relacionados con el ciclo celular (Lal et al., 2009a) y esta acción no canónica de miR-24 se extiende incluso a su efecto por apareamiento en el marco abierto de lectura de algunos genes (Qin et al., 2010). De hecho, el efecto de miR-24-3p mediante este tipo de apareamiento en el 3'UTR afecta a genes importantes como los factores de transcripción Myc y E2F2 (Lal et al., 2009a). Sin embargo, nuestro estudio excluye un efecto de este miRNA sobre los niveles del mRNA de IF1 ya sea por actividad transcripcional y/o por señalización de su degradación al ver la ausencia de cambios por RT-qPCR. La ausencia de cambios también confirmó que miR-24-3p actúa mediante inhibición traduccional del mRNA y no por su envío a degradación. Los estudios sobre miR-24 incluyen efectos muy variados sobre tres

situaciones básicas: cáncer, diferenciación y estrés cardiaco. En cáncer hay estudios que sugieren la importancia del miR-24-3p y en general de todo su cluster de expresión miR-23b/27b/24 en el cáncer de próstata y la progresión de la enfermedad (Goto et al., 2014). De hecho, la expresión de estos miRNAs inhibía significativamente la proliferación celular, la migración y la invasión. Algunos estudios le confieren al miR-24-3p una función supresora de tumores debido a su papel en aumentar apoptosis (Xie et al., 2013) en respuesta a tratamientos con drogas (Singh and Saini, 2012) estando su disminución relacionada con conferir resistencia a un cóctel de etoposido y cisplatino (Pan et al., 2015).

Un caso especialmente interesante es el de cáncer gástrico donde su efecto de supresor de tumores es muy evidente: sus niveles en tejidos tumorogénicos gástricos están muy disminuidos y su expresión ectópica suprime de nuevo la proliferación, migración e invasión así como la formación de tumores *in vivo* (Duan et al., 2014). En células de cáncer gástrico también se ha descrito que afecta al intercambiador de aniones AE1 inhibiendo la proliferación celular (Wu et al., 2010).

En una muestra pequeña de pacientes de carcinoma de colon es donde hemos observado una disminución significativa de los niveles de hsa-miR-24-3p que además coincide con la acumulación siempre de los niveles de proteína de IF1. Otros estudios apoyan este descubrimiento: el análisis de miR-24-3p en 95 pacientes de carcinoma colorectal reveló la disminución significativa en comparación con los tejidos normales correspondientes y se relacionó significativamente con la invasión, metástasis en los nódulos linfáticos y el estadio clínico de los pacientes (Gao et al., 2015). La misma deregulación de miR-24 se observó en carcinomas colorectales y adenomas colorectales (Gattolliat et al., 2015). La relación es tal que los bajos niveles de miR-24 en plasma incluso se han propuesto como un marcador diagnóstico de este tipo de carcinoma (Fang et al., 2015). Un estudio sugiere su potencial de arrestar las células en la fase del ciclo celular G2/S cuando está sobreexpresado y destaca de nuevo la disminución en pacientes de cáncer de colon (Mishra et al., 2009). No todos los estudios confieren un potencial supresor de tumores al miR-24-3p y parece que esto podría depender del tejido donde se expresa. En líneas de mama la expresión de miR-24-3p produce una mayor proliferación y resistencia a apoptosis (Lu et al., 2015), lo cual coincide con nuestra descripción de los efectos de miR-24-3p tejido-específicos así como con la observación de niveles aumentados del miRNA en tejidos tumorales de mama.

En cuanto a su papel en diferenciación es destacable que la depleción de miR-24-3p junto a miR-27, su compañero transcripcional en el cluster de expresión génico, en fibroblastos embrionarios de ratón promueve una reprogramación somática a iPSCs al afectar a factores de

pluripotencia como Oct4 o Foxo1 (Ma et al., 2015). Además de que su inhibición produce reprogramación a células madre, el efecto contrario, es decir su sobreexpresión, promueve la diferenciación hematopoiética (Lal et al., 2009b; Roy et al., 2015), epidérmica (Amelio et al., 2012) y muscular (Sun et al., 2008). Aunque se han identificado genes diana para cada una de estos procesos que podrían explicar su efecto, no hay que descartar que su efecto sobre la traducción de IF1 esté implicado en estos efectos por su implicación como factor de pluripotencialidad de células madre mesenquimales (Sanchez-Arago et al., 2013b). Sin embargo, no en todos los procesos de diferenciación miR-24 es pro-diferenciación: en el caso de la diferenciación eritropoiética miR-24 tiene un efecto negativo en parte por su efecto sobre el gen ALK4 (Wang et al., 2008).

Por último, miR-24 se ha identificado como un cardio-miR ya que en tejido cardíaco miR-24-3p está implicado en viabilidad de cardiomiocitos y tiene un efecto positivo después de lesión cardíaca. Aquí se pone de nuevo de manifiesto la importancia del tejido de estudio ya que altos niveles de miR-24-3p en cardiomiocitos de ratón tiene un efecto anti-apoptótico por inhibición de la ruta intrínseca de apoptosis (Wang and Qian, 2014), efecto parcialmente mediado *in vivo* en corazón de ratón por su efecto sobre la proteína Bim (Qian et al., 2011). Otros estudios en corazón de ratón también relacionan los niveles de miR-24 con apoptosis de células endoteliales y procesos de angiogénesis después de un infarto de miocardio (Fiedler et al., 2011). De hecho, este tipo de lesión produce una clara acumulación del miRNA (Fiedler et al., 2011) lo cual se puede relacionar muy claramente con que miR-24-3p es uno de los miRNAs inducido por hipoxia (Kulshreshtha et al., 2007) probablemente por un efecto directo de HIF-1 α por interacción de éste con el promotor del cluster miR-27a/23a/24-2 (Camps et al., 2014). La supresión de miR-24 con el uso *in vivo* de un anti-miRNA en un modelo de corazón de ratón con constricción aórtica mejoró claramente la función cardíaca (Li et al., 2013), e incluso se ha descrito que miR-24 junto a miR-21 y miR-221 transducidos en cardiomiocitos primarios producía un efecto pro-supervivencia muy acusado (Hu et al., 2011). Estos resultados coinciden con datos de un ratón transgénico de miR-24 sobreexpresado de manera específica en corazón donde se ha visto que en condiciones basales no hay grandes diferencias con los ratones control pero que, tras infarto de miocardio, la apoptosis en los cardiomiocitos era menor y la función cardíaca post-infarto mejor (Guo et al., 2015). Salvo su efecto de represión traduccional sobre la proteína pro-apoptótica Bim (Qian et al., 2011) y el factor de transcripción GATA2 (Fiedler et al., 2011) no se han descrito muchas más dianas de miR-24-3p que se relacionen con esta función de mejora cardíaca. En este caso el análisis de los ratones positivos por genotipo para IF1 humano que expresaban la proteína indicó que había un fenómeno de represión traduccional (sin cambios en el mRNA de IF1 humano) que impedía que todos los ratones expresaran la proteína. El descubrimiento de que miR-24-3p está muy aumentado en ratones

positivos que no expresan IF1 cuando comparamos con los ratones transgénicos que sí expresan indica que miR-24-3p se relaciona con la inhibición de IF1 y que IF1 podría ser un factor regulado en cardiomiocitos y relacionado con la eficiencia cardíaca. Faltaría determinar por qué mecanismo miR-24-3p aumenta su expresión en estos casos. En este sentido, se ha descrito que la activación de la ruta de TGF β (Shi and Massague, 2003) controla de manera positiva la expresión de miR-24 (Chan et al., 2010). Además, el estudio del promotor del cluster miR-27a/23a/24-2 en el cromosoma 19 humano con el genome browser de UCSC reveló la unión activa de esta zona con factores de transcripción relacionados con respuestas antioxidantes entre los que destacan los hetero-oligómeros del factor AP-1: c-Fos y c-Jun. La señalización por TGF β parece depender de los ROS mitocondriales generados por el complejo III (Jain et al., 2013) teniendo los ROS generados en el miocardio isquémico una función clave en el corazón post-lesión (Hori and Nishida, 2009). En este contexto, sería muy interesante saber si miR-24-3p se sobreexpresa ante estrés oxidativo o bloqueo de la cadena como el utilizado en esta tesis por incubación de las células con antimicina A, y si éste es el mecanismo que explicaría la alta inhibición de IF1 en corazón de ratones transgénicos más sabiendo que IF1 es una proteína generadora de ROS (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a).

5.2. Regulación de la actividad de IF1 y su relevancia fisiológica.

Previamente se había descrito la fosforilación de la S39 y la S63 del IF1 humano (Christensen et al., 2010; Sharma et al., 2014; Zhao et al., 2011; Zhou et al., 2013), que en la proteína humana madura corresponden a la S14 y S38, respectivamente. En esta tesis hemos demostrado que la fosforilación específica de la S39/S14 determina la actividad biológica de IF1 al prevenir su interacción con la H⁺-ATP sintasa. La fosforilación de IF1 no se restringe a una pequeña fracción de la proteína sino que puede afectar a todo el pool de IF1 presente en la célula como se demuestra en diferentes situaciones metabólicas. Las proteínas intrínsecamente desordenadas son importantes componentes de la señalización celular debido a que las transiciones conformacionales de desorden a orden pueden mediar funciones biológicas (Wright and Dyson, 2015) siendo la fosforilación de proteínas uno de los factores que regulan estas transiciones (Bah et al., 2014). El hecho de que IF1 sea una proteína intrínsecamente desordenada (Gordon-Smith et al., 2001) y que esta conformación del inhibidor sea esencial para la interacción inicial con el dominio F₁-ATPasa de la ATP-sintasa (Bason et al., 2014) indica la posibilidad de que la fosforilación de la S39/S14 promueva el plegamiento del IF1 intrínsecamente desordenado. Esta transición conformacional sería la que impida su capacidad para engancharse y entrar en su sitio de unión a la F₁-ATPasa. Otra posibilidad que no se puede excluir es que el impedimento estérico y/o las repulsiones electrostáticas de la S39/S14 fosforilada puedan contribuir en la interferencia de la unión de IF1 a su

sitio de unión en la ATP sintasa. En línea con esta repulsión electrostática es interesante que, situando la altamente conservada S39/S14 en la estructura cristalográfica del IF1 bovino inhibiendo a la ATP sintasa (Fig. 33), se ve que su emplazamiento en la estructura es en el único giro de la α -hélice que interacciona directamente con la subunidad γ (Bason et al., 2014).

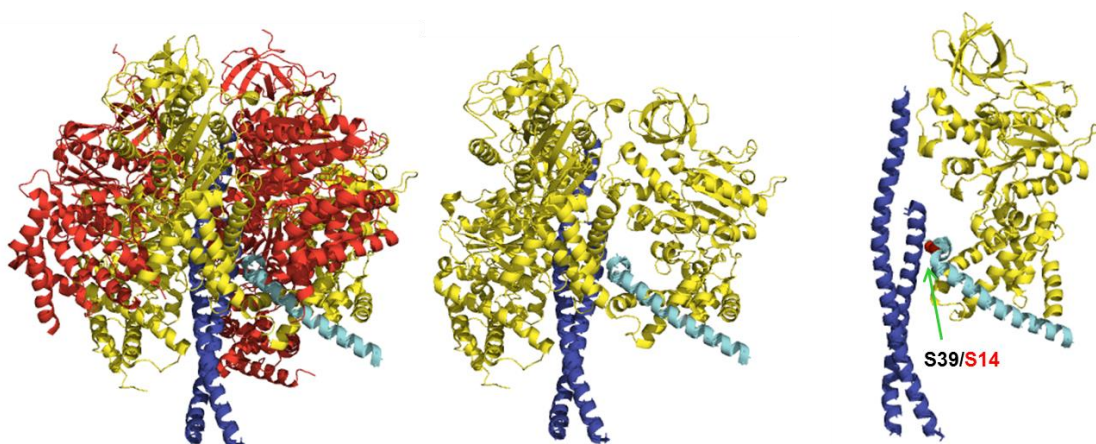


Figura 34. El residuo S39 se encuentra en la zona de interacción con la F1-ATPasa. Vista lateral de la F1-ATPasa con sus subunidades α (amarillo), β (rojo) y γ (azul) y su interacción con el fragmento 1-60 bovino de IF1 (azul claro). El residuo serina que se fosforila en IF1 humano maduro (S14) ha sido mapeado e indicado (esfera roja) en el fragmento bovino. S14/S39 contacta directamente con la subunidad γ .

La actividad de PKA está implicada en la fosforilación de IF1 desencadenando la activación de tanto la actividad sintasa como hidrolasa de la H^+ -ATP sintasa y por lo tanto apoyando que, cuando IF1 está unido al enzima, inhibe ambas actividades. Aunque nuestro grupo había demostrado anteriormente la inhibición de la respiración sensible a oligomicina cuando IF1 está sobreexpresado tanto en líneas celulares como en un modelo *in vivo* en cerebro de ratón (Formentini et al., 2014; Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a; Sanchez-Cenizo et al., 2010), aquí hemos demostrado que, tanto en células permeabilizadas como en mitocondria aislada de células y de corazón de ratón, IF1 unido a la H^+ -ATP sintasa inhibe la producción de ATP en mitocondria. Especialmente concluyentes son los experimentos de sobreexpresión con los fosfomutantes de IF1 S39A y S39E donde la actividad sintética de la H^+ -ATP sintasa presenta unos niveles muy reducidos (S39A) o similares al control (S39E) correspondientes a la unión (S39A) o no (S39E) del IF1 sobreexpresado.

Evidencias recientes demuestran que PKA regula multitud de funciones mitocondriales: el desencadenamiento de apoptosis (Danial et al., 2003; Dohi et al., 2007; Harada et al., 1999), dinámica mitocondrial (Cribbs and Strack, 2007; Dickey and Strack, 2011), mitofagia (Dagda et al., 2011; Gomes et al., 2011), metabolismo (Danial et al., 2003; Dyson et al., 2009) y también se encarga de promover el aumento de la eficiencia de la OXPHOS por fosforilación de proteínas mitocondriales de la CTE como son la subunidad NDUSF4 del complejo I (Papa et al., 2008) y las

subunidades del complejo IV COXII (Bender and Kadenbach, 2000) y COXIV-1 (Acin-Perez et al., 2011) regulando así la capacidad de síntesis de ATP (Di Benedetto et al., 2013). A pesar de esto hay que destacar que la relevancia fisiológica, sustratos mitocondriales y el sitio de acción de PKA son todavía motivo de debate (Di Benedetto et al., 2013; Valsecchi et al., 2013) a pesar de que se ha encontrado PKA dentro de la mitocondria (Pagliarini and Dixon, 2006). Concretamente se ha visto que PKA puede estar anclada a la membrana o dentro de la mitocondria en un amplio rango de especies de mamífero, incluido el humano (Corso and Thomson, 2001; Kleitke et al., 1976; Sardanelli et al., 2006). Incluso una isoforma de una subunidad reguladora específica (RI β) parece estar especialmente enriquecida en mitocondria (Ilouz et al., 2012). En nuestras manos PKA es incapaz de fosforilar IF1 en ensayos *in vitro* sugiriendo el requerimiento de proteínas adicionales para este proceso. Responsables de la regulación de la señalización en el espacio de PKA así como sirviendo de andamio son las proteínas de anclaje de la quinasa-A (AKAPs) (Wong and Scott, 2004). Hasta ahora se han descrito tres AKAPs que dirigen PKA a la mitocondria: D-AKAP1 (o AKAP-121) ancla PKA a la superficie citoplasmática de la membrana externa mitocondrial (Chen et al., 1997; Huang et al., 1997); WAVE-1 forma un complejo con PKA y con la proteína de membrana externa apoptótica BAD (Danial et al., 2003); y la proteína de interacción con esfingosina quinasa (SKIP), que se encuentra principalmente enriquecida en la membrana interna mitocondrial (Means et al., 2011). Las funciones de D-AKAP1 han sido ampliamente descritas: se asocia con ribosomas y con la maquinaria de importe mitocondrial, así como con mRNAs, siendo un fino ejemplo de regulación espacial y temporal (Carlucci et al., 2008). De hecho, la estimulación de la presencia del complejo de D-AKAP1 en mitocondria produce un aumento en la capacidad OXPHOS (Livigni et al., 2006) e incluso un estudio reciente indica que los corazones de ratón que sobreexpresan D-AKAP1 presentan una reducción de su estrés oxidativo (Sastri et al., 2013). Por todo esto no podemos desestimar que IF1 podría estar fosforilado por una PKA mitocondrial asistida por alguna proteína de anclaje aún no identificada.

Recientemente, también se ha descrito que PKA se encuentra dentro de la mitocondria y asociada con complejos de alto peso molecular de la membrana interna mitocondrial (Acin-Perez et al., 2014). Los experimentos en mitocondria aislada de células con IF1 defosforilado que se fosforila cuando añadimos db-cAMP exógeno indican que IF1 se fosforila dentro de la mitocondria dependiendo de PKA. Aunque el db-cAMP sí es permeable a las membranas tanto citoplasmática como nuclear, el cAMP fisiológico no atraviesa la membrana mitocondrial (Di Benedetto et al., 2013) por lo que la fosforilación de IF1 por una PKA mitocondrial debe asociarse al funcionamiento de la sAC mitocondrial (Acin-Perez et al., 2009) de manera similar a la regulación de COXIV-I (Acin-Perez et al., 2011). La implicación de esta sAC, que se activa por calcio (Di

Benedetto et al., 2013) y por bicarbonato (Acin-Perez et al., 2009), se demuestra indirectamente cuando vemos que células HCT116 cultivadas en ausencia de Ca^{2+} y de HCO_3^- presentan IF1 en su forma defosforilada y que la adición exógena de ambos compuestos al cultivo revierte parcialmente esta defosforilación. La adición de compuestos que activan la adenilato ciclasa transmembrana de la membrana plasmática (tmAC), como son la forskolina en activación de líneas celulares o los moduladores de la vía β -adrenérgica/cAMP/PKA clenbuterol y propanolol, también producen cambios en la fosforilación de IF1: en esta línea está establecido que la activación β -adrenérgica en músculo cardíaco resulta en la fosforilación y activación de proteínas diana implicadas en la provisión de precursores metabólicos con fines oxidativos (Christian et al., 1969) lo que conlleva un aumento en el Ca^{2+} citoplasmático (Kamp and Hell, 2000) que actúa como un elemento necesario para la activación de la OXPHOS (Glancy and Balaban, 2012). El Ca^{2+} intracelular desencadena la contracción de las fibras musculares y subsecuentemente es secuestrado por la mitocondria (Rizzuto et al., 2012) donde activará la sAC, aumentando así la concentración de cAMP. De hecho, cuando medimos los niveles de cAMP en mitocondria aislada de corazones de ratón tratados con clenbuterol pudimos observar un aumento significativo al compararlos con los animales sin tratar, apoyando que es realmente el cAMP mitocondrial el que desencadena la fosforilación de IF1.

Es razonable sugerir también que la defosforilación de IF1, y por lo tanto la activación de su función inhibidora, puede ser fruto de la actividad de una fosfatasa mitocondrial (Fig. 34), aunque el hecho de que IF1 sea una proteína de vida media muy corta (~ 4 h) (Sanchez-Arago et al., 2013a) también deja abierta la posibilidad de que la alta tasa de renovación proteica reestablezca el potencial inhibidor de IF1 sobre la H^+ -ATP sintasa. La existencia de una fosfatasa específica de mitocondria como es la PTPMT1 (Pagliarini et al., 2005) y en general de diversas fosfatasas celulares ancladas en la membrana externa o dentro de la mitocondria como PP2A, Tim50 o PP1 (Pagliarini and Dixon, 2006) pone de manifiesto la potencial regulación del estado de fosforilación de IF1 de manera intramitocondrial. De cualquier manera la incubación a tiempos muy cortos (10 min) de mitocondrias aisladas de células HCT116 en presencia de db-cAMP y ausencia de inhibidores de fosfatasas no resultó en un IF1 defosforilado por lo que el efecto de PKA estimulada parece predominar sobre el posible efecto de una fosfatasa intramitocondrial.

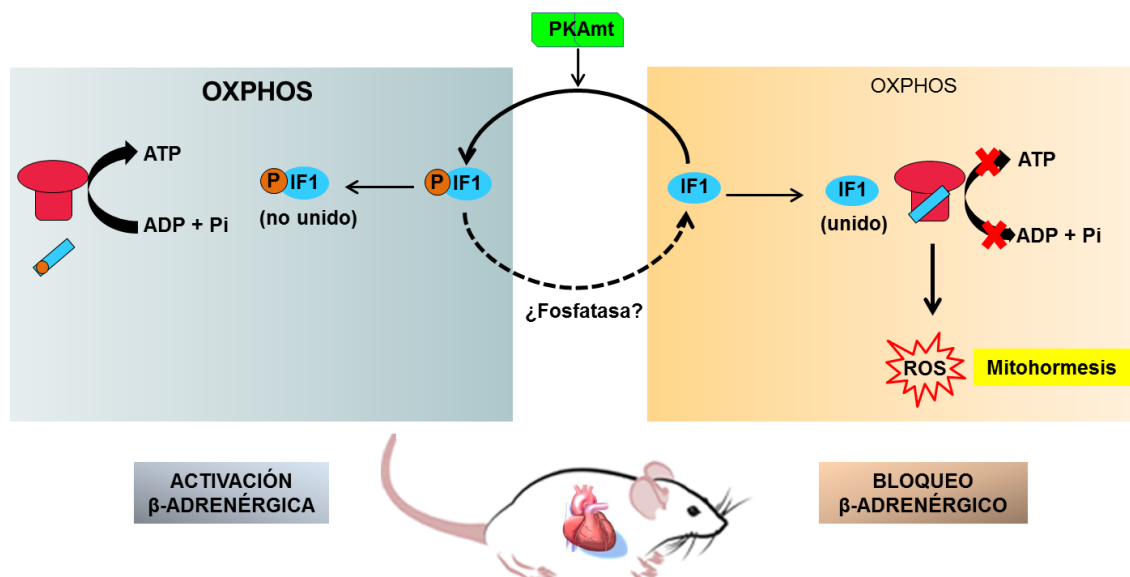


Figura 35. La fosforilación por PKA de IF1 determina la obtención de ATP por fosforilación oxidativa. IF1 (esfera y bastón azul) se fosforila (esfera naranja) por PKA dentro de la mitocondria (rectángulo verde) lo que determina que no se una a la H^+ -ATP sintasa (esfera y rectángulo rojo) y la capacidad de generar ATP por OXPHOS esté al máximo. La no fosforilación de IF1 o potencial fosforilación por una fosfatasa (flecha punteada) permite al inhibidor unirse al complejo e inhibir sus dos actividades, generando una señal de ROS que puede señalar supervivencia (mitohormesis). Ambas situaciones se ilustran con el ejemplo de corazón de ratón estimulado o bloqueado adrenérgicamente.

La función biológica principal sugerida para IF1 es la de prevenir la hidrólisis de ATP y el malgasto energético durante situaciones que comprometen la fuerza protón-motriz como son la hipoxia o el fallo de la CTE (Campanella et al., 2008; Chen et al., 2014; Gledhill et al., 2007; Walker, 2013). Previamente se ha descrito que la desagregación y activación de IF1 parece estar controlada por el estado iónico de un residuo histidina (H49) que proporciona un cambio sensible a pH entre los estados inactivo y activo de la proteína a valores relativamente bajos de pH intramitocondrial (Cabezón et al., 2000b). El mecanismo que se describe aquí no compromete la comprensión de la regulación de la función de IF1 por pH sino que la amplía porque solamente el IF1 defosforilado puede unirse y ejercer su acción inhibitoria. Además es destacable que la condición de hipoxia tanto química como por restricción de oxígeno produce un desplazamiento del equilibrio hacia IF1 defosforilado y por lo tanto activo, de acuerdo a la regulación positiva de la inhibición por hipoxia relacionada con H49K. La regulación del estado de fosforilación de IF1 según la demanda energética asociada a inhibición de las vías de obtención de energía así como a procesos celulares como el estado del ciclo celular no hacen sino reforzar que IF1 es uno de los factores necesarios para la reprogramación metabólica.

Esta rápida y efectiva regulación de la actividad inhibitoria de IF1 explica la paradoja que habíamos descrito anteriormente al respecto de los altos niveles de expresión de IF1 en algunos

tejidos con alta demanda energética (cerebro, riñón o corazón) (Sanchez-Cenizo et al., 2010). Los experimentos en corazón de ratón revelan que una fracción de IF1 puede estar fosforilada y por lo tanto inactiva mientras otra se encuentra en su forma activa defosforilada, ofreciendo así un reservorio o margen de acción que permita el aumentar la capacidad OXPHOS del tejido en respuesta a una alta demanda energética, como se demuestra en ratones tratados con clenbuterol y la subsecuente aumentada producción de ATP por parte de la mitocondria. Un interrogante es cuál es el posible rol de la fracción activa de IF1 e inhibiendo la ATP sintasa en tejidos de alta demanda energética: una hipótesis probable es que esta fracción de IF1 permita el ya mencionado ajuste de la producción de ATP. Otra posibilidad es que la inhibición de una fracción de H^+ -ATP sintasa por IF1 pueda estar implicada en la modulación de la célula por mitohormesis (Yun and Finkel, 2014). De hecho esta inhibición mediada por IF1 promueve la producción de anión superóxido (Formentini et al., 2012; Sanchez-Arago et al., 2013a) generando una señal de supervivencia y evasión de muerte proporcionando relevancia a su función como señalizador vía ROS.

Todo indica a que la fosforilación o no de IF1 en su S39 determina una función, estabilidad y probablemente un elenco de proteínas de interacción diferentes entre estado fosforilado y defosforilado, permitiendo que este importante regulador de ambas actividades de la H^+ -ATP sintasa pueda ser utilizado dependiendo del contexto celular y sus necesidades energéticas.

6. CONCLUSIONES.

1. La acumulación de la proteína IF1 observada en carcinomas se produce por mecanismos de regulación post-transcripcional que afectan la expresión de la isoforma 1 de la proteína.
2. La proteína de unión a RNA LRPPRC, que está implicada en la regulación *in vivo* de la expresión de IF1 en corazón, interacciona de manera directa con el mRNA de IF1.
3. El microRNA miR-24-3p se une al 3'UTR del mRNA de IF1 e inhibe su traducción.
4. Los ROS de origen mitocondrial generados por el bloqueo del complejo III de la CTE con antimicina A inhiben de manera específica la traducción del mRNA de IF1.
5. La PKA mitocondrial fosforila a IF1 humano en su residuo S39 previniendo la unión del inhibidor al complejo de la H^+ -ATP sintasa y por tanto lo inactiva.
6. IF1 defosforilado se une a la H^+ -ATP sintasa y, contrariamente a lo mantenido a lo largo de estos años, inhibe la actividad sintética e hidrolítica de la H^+ -ATP sintasa.
7. La fosforilación de IF1 regula el aporte energético mitocondrial en situaciones como el ciclo celular, la hipoxia, el cáncer o la estimulación adrenérgica en corazón de ratón.
8. El estado de fosforilación de IF1 determina la vida media de la proteína: IF1 fosforilado presenta una vida más media corta (~ 4 h) mientras que defosforilado es mucho más estable. La degradación de IF1 parece estar mediada por la metaloproteasa YME1L y la familia de las serín-proteasas mitocondriales y depender de señales que emanan de la mitocondria.

7. REFERENCIAS.

- Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A.D., Fernandez, P.L., Roncador, G., Fernandez-Malave, E., Chamorro, M., and Cuezva, J.M. (2009). Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl Oncol* 2, 138-145.
- Acin-Perez, R., Carrascoso, I., Baixauli, F., Roche-Molina, M., Latorre-Pellicer, A., Fernandez-Silva, P., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., Perez-Martos, A., Lowell, C.A., Manfredi, G., and Enriquez, J.A. (2014). ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metab* 19, 1020-1033.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.
- Acin-Perez, R., Gatti, D.L., Bai, Y., and Manfredi, G. (2011). Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab* 13, 712-719.
- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R., and Manfredi, G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 9, 265-276.
- Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.A., Licznarski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G.A., Jr., and Jonas, E.A. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10580-10585.
- Altieri, D.C. (2013). Mitochondrial HSP90s and tumor cell metabolism. *Autophagy* 9, 244-245.
- Amelio, I., Lena, A.M., Viticchie, G., Shalom-Feuerstein, R., Terrinoni, A., Dinsdale, D., Russo, G., Fortunato, C., Bonanno, E., Spagnoli, L.G., Aberdam, D., Knight, R.A., Candi, E., and Melino, G. (2012). miR-24 triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration. *J Cell Biol* 199, 347-363.
- Ando, C., and Ichikawa, N. (2008). Glutamic acid in the inhibitory site of mitochondrial ATPase inhibitor, IF(1), participates in pH sensing in both mammals and yeast. *J Biochem* 144, 547-553.
- Anesti, V., and Scorrano, L. (2006). The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1757, 692-699.
- Baggio, F., Bratic, A., Mourier, A., Kauppila, T.E., Tain, L.S., Kukat, C., Habermann, B., Partridge, L., and Larsson, N.G. (2014). *Drosophila melanogaster* LRPPRC2 is involved in coordination of mitochondrial translation. *Nucleic Acids Res* 42, 13920-13938.
- Bah, A., Vernon, R.M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L.E., and Forman-Kay, J.D. (2014). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519, 106-109.

- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Barbato, S., Sgarbi, G., Gorini, G., Baracca, A., and Solaini, G. (2015). The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics. *J Biol Chem* 290, 6338-6348.
- Barrientos, A., Fontanesi, F., and Diaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 19, Unit19 13.
- Bason, J.V., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2014). Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 11305-11310.
- Bason, J.V., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2011). Binding of the inhibitor protein IF(1) to bovine F(1)-ATPase. *J Mol Biol* 406, 443-453.
- Belogrudov, G.I. (2009). Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B. *J Bioenerg Biomembr* 41, 137-143.
- Bender, E., and Kadenbach, B. (2000). The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett* 466, 130-134.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155.
- Bisetto, E., Comelli, M., Salzano, A.M., Picotti, P., Scaloni, A., Lippe, G., and Mavelli, I. (2013). Proteomic analysis of F1F0-ATP synthase super-assembly in mitochondria of cardiomyoblasts undergoing differentiation to the cardiac lineage. *Biochim Biophys Acta* 1827, 807-816.
- Blencowe, B.J. (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126, 37-47.
- Bota, D.A., and Davies, K.J. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4, 674-680.
- Brand, K.A., and Hermfisse, U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11, 388-395.
- Bratic, A., Wredenberg, A., Gronke, S., Stewart, J.B., Mourier, A., Ruzzenente, B., Kukat, C., Wibom, R., Habermann, B., Partridge, L., and Larsson, N.G. (2011). The bicoid stability factor controls polyadenylation and expression of specific mitochondrial mRNAs in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 7, e1002324.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., and Walker, J.E. (2000a). Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *J Biol Chem* 275, 28353-28355.

Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., Carbajo, R.J., and Walker, J.E. (2002). Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem* 277, 41334-41341.

Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., and Walker, J.E. (2000b). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* 275, 25460-25464.

Cabezón, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 10, 744-750.

Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2001). The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J* 20, 6990-6996.

Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11, 25-44.

Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., and Duchon, M.R. (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* 8, 13-25.

Camps, C., Saini, H.K., Mole, D.R., Choudhry, H., Reczko, M., Guerra-Assuncao, J.A., Tian, Y.M., Buffa, F.M., Harris, A.L., Hatzigeorgiou, A.G., Enright, A.J., and Ragoussis, J. (2014). Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol Cancer* 13, 28.

Carlucci, A., Lignitto, L., and Feliciello, A. (2008). Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol* 18, 604-613.

Cintron, N.M., and Pedersen, P.L. (1979). A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* 254, 3439-3443.

Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160-171.

Contessi, S., Comelli, M., Cmet, S., Lippe, G., and Mavelli, I. (2007). IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F (1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr* 39, 291-300.

Contessi, S., Haraux, F., Mavelli, I., and Lippe, G. (2005). Identification of a conserved calmodulin-binding motif in the sequence of F0F1 ATP synthase inhibitor protein. *J Bioenerg Biomembr* 37, 317-326.

Cooper, M.P., Qu, L., Rohas, L.M., Lin, J., Yang, W., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes Dev* 20, 2996-3009.

Cooper, M.P., Uldry, M., Kajimura, S., Arany, Z., and Spiegelman, B.M. (2008). Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J Biol Chem* 283, 31960-31967.

Corso, M., and Thomson, M. (2001). Protein phosphorylation in mitochondria from human placenta. *Placenta* 22, 432-439.

Covian, R., and Balaban, R.S. (2012). Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H940-966.

Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8, 939-944.

Cuezva, J.M., Chen, G., Alonso, A.M., Isidoro, A., Misek, D.E., Hanash, S.M., and Beer, D.G. (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25, 1157-1163.

Cuezva, J.M., Chitra, C.I., and Patel, M.S. (1982). The newborn of diabetic rat. II. Impaired gluconeogenesis in the postnatal period. *Pediatr Res* 16, 638-643.

Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J.C. (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62, 6674-6681.

Cuezva, J.M., Ortega, A.D., Willers, I., Sanchez-Cenizo, L., Aldea, M., and Sanchez-Arago, M. (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta* 1792, 1145-1158.

Cuezva, J.M., Sanchez-Arago, M., Sala, S., Blanco-Rivero, A., and Ortega, A.D. (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39, 259-265.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-740.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.

Chan, M.C., Hilyard, A.C., Wu, C., Davis, B.N., Hill, N.S., Lal, A., Lieberman, J., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFbeta family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *EMBO J* 29, 559-573.

Chaneton, B., and Gottlieb, E. (2012). Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. *Trends Biochem Sci* 37, 309-316.

Chen, Q., Lin, R.Y., and Rubin, C.S. (1997). Organelle-specific targeting of protein kinase AII (PKAII). Molecular and in situ characterization of murine A kinase anchor proteins that recruit regulatory subunits of PKAII to the cytoplasmic surface of mitochondria. *J Biol Chem* 272, 15247-15257.

Chen, W.W., Birsoy, K., Mihaylova, M.M., Snitkin, H., Stasinski, I., Yucel, B., Bayraktar, E.C., Carette, J.E., Clish, C.B., Brummelkamp, T.R., Sabatini, D.D., and Sabatini, D.M. (2014). Inhibition of ATPIF1 ameliorates severe mitochondrial respiratory chain dysfunction in mammalian cells. *Cell Rep* 7, 27-34.

Chen, Z., and McKnight, S.L. (2007). A conserved DNA damage response pathway responsible for coupling the cell division cycle to the circadian and metabolic cycles. *Cell Cycle* 6, 2906-2912.

Chin, R.M., Fu, X., Pai, M.Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V.S., Monsalve, G.C., Hu, E., Whelan, S.A., Wang, J.X., Jung, G., Solis, G.M., Fazlollahi, F., Kaweeteerawat, C., Quach, A., Nili, M., Krall, A.S., Godwin, H.A., Chang, H.R., Faull, K.F., Guo, F., Jiang, M., Trauger, S.A., Saghatelian, A., Braas, D., Christofk, H.R., Clarke, C.F., Teitell, M.A., Petrascheck, M., Reue, K., Jung, M.E., Frand, A.R., and Huang, J. (2014). The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 510, 397-401.

Christensen, G.L., Kelstrup, C.D., Lyngso, C., Sarwar, U., Bogebo, R., Sheikh, S.P., Gammeltoft, S., Olsen, J.V., and Hansen, J.L. (2010). Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics* 9, 1540-1553.

Christian, D.R., Kilsheimer, G.S., Pettett, G., Paradise, R., and Ashmore, J. (1969). Regulation of lipolysis in cardiac muscle: a system similar to the hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Adv Enzyme Regul* 7, 71-82.

D'Autreaux, B., and Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 813-824.

Dagda, R.K., Gusdon, A.M., Pien, I., Strack, S., Green, S., Li, C., Van Houten, B., Cherra, S.J., 3rd, and Chu, C.T. (2011). Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 18, 1914-1923.

Damianov, A., and Black, D.L. (2010). Autoregulation of Fox protein expression to produce dominant negative splicing factors. *RNA* 16, 405-416.

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., Gygi, S.P., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.

Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H.D., and Kuhlbrandt, W. (2013). Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15301-15306.

Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J.D., and Kuhlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13602-13607.

DeLaBarre, B., Hurov, J., Cianchetta, G., Murray, S., and Dang, L. (2014). Action at a distance: allostery and the development of drugs to target cancer cell metabolism. *Chem Biol* 21, 1143-1161.

Di Benedetto, G., Scalzotto, E., Mongillo, M., and Pozzan, T. (2013). Mitochondrial Ca(2)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab* 17, 965-975.

Dickey, A.S., and Strack, S. (2011). PKA/AKAP1 and PP2A/Bbeta2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci* 31, 15716-15726.

Dohi, T., Xia, F., and Altieri, D.C. (2007). Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* 27, 17-28.

Duan, Y., Hu, L., Liu, B., Yu, B., Li, J., Yan, M., Yu, Y., Li, C., Su, L., Zhu, Z., Xiang, M., and Yang, Q. (2014). Tumor suppressor miR-24 restrains gastric cancer progression by downregulating RegIV. *Mol Cancer* 13, 127.

Dyson, M.T., Kowalewski, M.P., Manna, P.R., and Stocco, D.M. (2009). The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol* 300, 94-103.

Faccenda, D., Tan, C.H., Seraphim, A., Duchon, M.R., and Campanella, M. (2013). IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ* 20, 686-697.

Fang, Z., Tang, J., Bai, Y., Lin, H., You, H., Jin, H., Lin, L., You, P., Li, J., Dai, Z., Liang, X., Su, Y., Hu, Q., Wang, F., and Zhang, Z.Y. (2015). Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 34, 86.

Fiedler, J., Jazbutyte, V., Kirchmaier, B.C., Gupta, S.K., Lorenzen, J., Hartmann, D., Galuppo, P., Kneitz, S., Pena, J.T., Sohn-Lee, C., Loyer, X., Soutschek, J., Brand, T., Tuschl, T., Heineke, J., Martin, U., Schulte-Merker, S., Ertl, G., Engelhardt, S., Bauersachs, J., and Thum, T. (2011). MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* 124, 720-730.

Formentini, L., Pereira, M.P., Sanchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J.J., Navarro, C., Martinez-Serrano, A., and Cuezva, J.M. (2014). In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J* 33, 762-778.

Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L., and Cuezva, J.M. (2012). The mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol. Cell* 45, 731-742.

Forner, F., Foster, L.J., Campanaro, S., Valle, G., and Mann, M. (2006). Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol Cell Proteomics* 5, 608-619.

Forner, F., Kumar, C., Lubner, C.A., Fromme, T., Klingenspor, M., and Mann, M. (2009). Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab* 10, 324-335.

Fu, X., Chin, R.M., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Xing, Y., Pai, M.Y., Li, S., Ta, L., Fazlollahi, F., Chen, C., Prins, R.M., Teitell, M.A., Nathanson, D.A., Lai, A., Faull, K.F., Jiang, M., Clarke, S.G., Cloughesy, T.F., Graeber, T.G., Braas, D., Christofk, H.R., Jung, M.E., Reue, K., and Huang, J. (2015). 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab* 22, 508-515.

Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J., and Yoshida, M. (2012). Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. *J Biol Chem* 287, 18781-18787.

Gao, Y., Liu, Y., Du, L., Li, J., Qu, A., Zhang, X., Wang, L., and Wang, C. (2015). Down-regulation of miR-24-3p in colorectal cancer is associated with malignant behavior. *Med Oncol* 32, 362.

Garcia, J.J., Morales-Rios, E., Cortes-Hernandez, P., and Rodriguez-Zavala, J.S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry* 45, 12695-12703.

Garcia, M.N., Grasso, D., Lopez-Millan, M.B., Hamidi, T., Loncle, C., Tomasini, R., Lomberg, G., Porteu, F., Urrutia, R., and Iovanna, J.L. (2014). IER3 supports KRASG12D-dependent pancreatic cancer development by sustaining ERK1/2 phosphorylation. *J Clin Invest* 124, 4709-4722.

Gattolliat, C.H., Uguen, A., Pesson, M., Trillet, K., Simon, B., Doucet, L., Robaszkiewicz, M., and Corcos, L. (2015). MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 51, 409-420.

Gerbeth, C., Schmidt, O., Rao, S., Harbauer, A.B., Mikropoulou, D., Opalinska, M., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2013). Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab* 18, 578-587.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., and Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5887-5892.

Glancy, B., and Balaban, R.S. (2012). Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 51, 2959-2973.

Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2007). How the regulatory protein, IF1, inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15671-15676.

Gohil, V.M., Nilsson, R., Belcher-Timme, C.A., Luo, B., Root, D.E., and Mootha, V.K. (2010). Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *J Biol Chem* 285, 13742-13747.

Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589-598.

Gomez-Puyou, A., de Gomez-Puyou, M.T., and Ernster, L. (1979). Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 547, 252-257.

Gordon-Smith, D.J., Carbajo, R.J., Yang, J.C., Videler, H., Runswick, M.J., Walker, J.E., and Neuhaus, D. (2001). Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF(1): the inhibitor protein of F(1) ATPase. *J Mol Biol* 308, 325-339.

Goto, Y., Kojima, S., Nishikawa, R., Enokida, H., Chiyomaru, T., Kinoshita, T., Nakagawa, M., Naya, Y., Ichikawa, T., and Seki, N. (2014). The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget* 5, 7748-7759.

Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 345, 1250256.

Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27, 91-105.

Grimsrud, P.A., Carson, J.J., Hebert, A.S., Hubler, S.L., Niemi, N.M., Bailey, D.J., Jochem, A., Stapleton, D.S., Keller, M.P., Westphall, M.S., Yandell, B.S., Attie, A.D., Coon, J.J., and Pagliarini, D.J. (2012). A quantitative map of the liver mitochondrial phosphoproteome reveals posttranslational control of ketogenesis. *Cell Metab* 16, 672-683.

Guo, C., Deng, Y., Liu, J., and Qian, L. (2015). Cardiomyocyte-specific role of miR-24 in promoting cell survival. *J Cell Mol Med* 19, 103-112.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35, 505-513.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D., and Korsmeyer, S.J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3, 413-422.

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25, 1895-1908.

Harmel, J., Ruzzenente, B., Terzioglu, M., Spahr, H., Falkenberg, M., and Larsson, N.G. (2013). The leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein (LRPPRC) does not activate transcription in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 288, 15510-15519.

Harris, D.A., von Tscharner, V., and Radda, G.K. (1979). The ATPase inhibitor protein in oxidative phosphorylation. The rate-limiting factor to phosphorylation in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 548, 72-84.

Hashimoto, T., Negawa, Y., and Tagawa, K. (1981). Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase--stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J Biochem* 90, 1151-1157.

Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1984). Purification and properties of factors in yeast mitochondria stabilizing the F1F0-ATPase-inhibitor complex. *J Biochem* 95, 131-136.

Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1990). Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem* 108, 17-20.

Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54, 1015-1069.

Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19, 81-88.

Haynes, C.M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., and Ron, D. (2007). ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13, 467-480.

Haynes, C.M., and Ron, D. (2010). The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123, 3849-3855.

Haynes, V., Traaseth, N.J., Elfering, S., Fujisawa, Y., and Giulivi, C. (2010). Nitration of specific tyrosines in FoF1 ATP synthase and activity loss in aging. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E978-987.

He, W., Newman, J.C., Wang, M.Z., Ho, L., and Verdin, E. (2012). Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23, 467-476.

Hegy, H., and Tompa, P. (2008). Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput Biol* 4, e1000017.

Heinzen, E.L., Ge, D., Cronin, K.D., Maia, J.M., Shianna, K.V., Gabriel, W.N., Welsh-Bohmer, K.A., Hulette, C.M., Denny, T.N., and Goldstein, D.B. (2008). Tissue-specific genetic control of splicing: implications for the study of complex traits. *PLoS Biol* 6, e1.

Hekman, C., Tomich, J.M., and Hatefi, Y. (1991). Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F0 subunits. *J. Biol. Chem.* 266, 13564-13571.

Hernlund, E., Hjerpe, E., Avall-Lundqvist, E., and Shoshan, M. (2009). Ovarian carcinoma cells with low levels of beta-F1-ATPase are sensitive to combined platinum and 2-deoxy-D-glucose treatment. *Mol Cancer Ther* 8, 1916-1923.

Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12, 703-719.

Hock, M.B., and Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 71, 177-203.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118, 5411-5419.

Hori, M., and Nishida, K. (2009). Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 81, 457-464.

Hornig-Do, H.T., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., Rotig, A., Hellmich, M., Nijtmans, L., and Wiesner, R.J. (2012). Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J* 31, 1293-1307.

Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.
Hu, S., Huang, M., Nguyen, P.K., Gong, Y., Li, Z., Jia, F., Lan, F., Liu, J., Nag, D., Robbins, R.C., and Wu, J.C. (2011). Novel microRNA prosurvival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation. *Circulation* 124, S27-34.

Huang, L.J., Chuang, I.C., Dong, H.P., and Yang, R.C. (2011). Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock* 36, 90-96.

Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J., and Taylor, S.S. (1997). D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11184-11189.
Husain, I., and Harris, D.A. (1983). ATP synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles subjected to an acid-base transition. Effects of the ATPase inhibitor protein. *FEBS Lett* 160, 110-114.

Ichikawa, N., Ando, C., and Fumino, M. (2006). *Caenorhabditis elegans* MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast FOF1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 38, 93-99.

Ichikawa, N., Chisuwa, N., Tanase, M., and Nakamura, M. (2005). Mitochondrial ATP synthase residue betaarginine-408, which interacts with the inhibitory site of regulatory protein IF1, is essential for the function of the enzyme. *J Biochem* 138, 201-207.

Ilouz, R., Bubis, J., Wu, J., Yim, Y.Y., Deal, M.S., Kornev, A.P., Ma, Y., Blumenthal, D.K., and Taylor, S.S. (2012). Localization and quaternary structure of the PKA R1beta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12443-12448.

Iorio, M.V., and Croce, C.M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33, 1126-1133.

Isidoro, A., Casado, E., Redondo, A., Acebo, P., Espinosa, E., Alonso, A.M., Cejas, P., Hardisson, D., Fresno Vara, J.A., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., and Cuezva, J.M. (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26, 2095-2104.

Isidoro, A., Martinez, M., Fernandez, P.L., Ortega, A.D., Santamaria, G., Chamorro, M., Reed, J.C., and Cuezva, J.M. (2004). Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378, 17-20.

Jain, M., Rivera, S., Monclus, E.A., Synenki, L., Zirk, A., Eisenbart, J., Feghali-Bostwick, C., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 288, 770-777.

Jung, T., Hohn, A., and Grune, T. (2013). The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol* 2C, 99-104.

Kamp, T.J., and Hell, J.W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87, 1095-1102.

Karbowski, M., and Youle, R.J. (2011). Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Cell Biol* 23, 476-482.

Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39, 1278-1284.

Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc* 4, 1513-1521.

Kioka, H., Kato, H., Fujikawa, M., Tsukamoto, O., Suzuki, T., Imamura, H., Nakano, A., Higo, S., Yamazaki, S., Matsuzaki, T., Takafuji, K., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Shintani, Y., Yoshida, M., Noji, H., Kitakaze, M., Komuro, I., Asano, Y., and Takashima, S. (2014). Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 273-278.

Klein, G., Lunardi, J., and Vignais, P.V. (1981). Effect of the natural ATPase inhibitor on the binding of adenine nucleotides and inorganic phosphate to mitochondrial F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 636, 185-192.

Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C., and Vignais, P.V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C)isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* 19, 2919-2925.

Kleitke, B., Sydow, H., and Wollenberger, A. (1976). Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in isolated guinea pig and rat liver mitochondria. *Acta Biol Med Ger* 35, K9-K17.

Kondoh, H., Leonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., and Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9, 293-299.

Kornmann, B., and Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 123, 1389-1393.

Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.F., Saeki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162-166.

Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.

Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., and Ivan, M. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 27, 1859-1867.

Lagouge, M., Mourier, A., Lee, H.J., Spahr, H., Wai, T., Kukat, C., Silva Ramos, E., Motori, E., Busch, J.D., Siira, S., Kremmer, E., Filipovska, A., and Larsson, N.G. (2015). SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation. *PLoS Genet* 11, e1005423.

Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K.G., Gorospe, M., Hide, W., and Lieberman, J. (2009a). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* 35, 610-625.

Lal, A., Pan, Y., Navarro, F., Dykxhoorn, D.M., Moreau, L., Meire, E., Bentwich, Z., Lieberman, J., and Chowdhury, D. (2009b). miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 492-498.

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P.M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M.A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarra, E., and Enriquez, J.A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567-1570.

LeBleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., de Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., Asara, J.M., and Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 16, 992-1003, 1001-1015.

Lefebvre, V., Du, Q., Baird, S., Ng, A.C., Nascimento, M., Campanella, M., McBride, H.M., and Screatton, R.A. (2013). Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy. *Autophagy* 9.

Levine, A.J., and Puzio-Kuter, A.M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340-1344.

Li, R.C., Tao, J., Guo, Y.B., Wu, H.D., Liu, R.F., Bai, Y., Lv, Z.Z., Luo, G.Z., Li, L.L., Wang, M., Yang, H.Q., Gao, W., Han, Q.D., Zhang, Y.Y., Wang, X.J., Xu, M., and Wang, S.Q. (2013). In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res* 112, 601-605.

Li, R.J., Zhang, G.S., Chen, Y.H., Zhu, J.F., Lu, Q.J., Gong, F.J., and Kuang, W.Y. (2010). Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann Oncol* 7, 1506-1514.

Lin, P.C., Lin, J.K., Yang, S.H., Wang, H.S., Li, A.F., and Chang, S.C. (2008). Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis* 23, 1223-1232.

Lippe, G., Sorgato, M.C., and Harris, D.A. (1988). Kinetics of the release of the mitochondrial inhibitor protein. Correlation with synthesis and hydrolysis of ATP. *Biochim Biophys Acta* 933, 1-11.

Livigni, A., Scorziello, A., Agnese, S., Adornetto, A., Carlucci, A., Garbi, C., Castaldo, I., Annunziato, L., Avvedimento, E.V., and Feliciello, A. (2006). Mitochondrial AKAP121 links cAMP and src signaling to oxidative metabolism. *Mol Biol Cell* 17, 263-271.

Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J.M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67, 9013-9017.

Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y.I., Venkatesh, S., Bogenhagen, D.F., Temiakov, D., and Suzuki, C.K. (2013). Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell* 49, 121-132.

Lu, K., Wang, J., Song, Y., Zhao, S., Liu, H., Tang, D., Pan, B., Zhao, H., and Zhang, Q. (2015). miRNA-24-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting p27Kip1. *Oncol Rep* 34, 995-1002.

Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C., and Olsen, J.V. (2012). Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep* 2, 419-431.

Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 479-490.

Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 441-464.

Lytovchenko, O., Naumenko, N., Oeljeklaus, S., Schmidt, B., von der Malsburg, K., Deckers, M., Warscheid, B., van der Laan, M., and Rehling, P. (2014). The INA complex facilitates assembly of the peripheral stalk of the mitochondrial F₁F_o-ATP synthase. *EMBO J* 33, 1624-1638.

Ma, Y., Yao, N., Liu, G., Dong, L., Liu, Y., Zhang, M., Wang, F., Wang, B., Wei, X., Dong, H., Wang, L., Ji, S., Zhang, J., Wang, Y., Huang, Y., and Yu, J. (2015). Functional screen reveals essential roles of miR-27a/24 in differentiation of embryonic stem cells. *EMBO J* 34, 361-378.

Martin, K.C., and Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136, 719-730.

Martinez-Reyes, I. (2012). Mecanismos y vías de señalización implicados en la reprogramación metabólica en cáncer de colon. Tesis Doctoral.

Martinez-Reyes, I., and Cuezva, J.M. (2014). The H⁽⁺⁾-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim Biophys Acta* 1837, 1099-1112.

Mathias, R.A., Greco, T.M., Oberstein, A., Budayeva, H.G., Chakrabarti, R., Rowland, E.A., Kang, Y., Shenk, T., and Cristea, I.M. (2014). Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* 159, 1615-1625.

Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., and Reed, J.C. (1998). The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1, 327-336.

McLelland, G.L., Soubannier, V., Chen, C.X., McBride, H.M., and Fon, E.A. (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J* 33, 282-295.

Means, C.K., Lygren, B., Langeberg, L.K., Jain, A., Dixon, R.E., Vega, A.L., Gold, M.G., Petrosyan, S., Taylor, S.S., Murphy, A.N., Ha, T., Santana, L.F., Tasken, K., and Scott, J.D. (2011). An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1227-1235.

Medicherla, B., and Goldberg, A.L. (2008). Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* 182, 663-673.

Metelkin, E., Goryanin, I., and Demin, O. (2006). Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase. *Biophys J* 90, 423-432.

Mili, S., and Pinol-Roma, S. (2003). LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* 23, 4972-4982.

Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., and Garcia, J.J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12356-12358.

Mishra, P.J., Song, B., Wang, Y., Humeniuk, R., Banerjee, D., Merlino, G., Ju, J., and Bertino, J.R. (2009). MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism. *PLoS One* 4, e8445.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Mitchell, P., and Moyle, J. (1965). Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature* 208, 1205-1206.

Miyazaki, T., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W.C., and Baron, R. (2003). Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 160, 709-718.

Mootha, V.K., Bunkenborg, J., Olsen, J.V., Hjerrild, M., Wisniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E.S., and Mann, M. (2003a). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115, 629-640.

Mootha, V.K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G.A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T.J., Robinson, B., Rioux, J.D., and Lander, E.S. (2003b). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 605-610.

Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Kuhlbrandt, W., and Larsson, N.G. (2014). Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum Mol Genet* 23, 2580-2592.

Nakamura, J., Fujikawa, M., and Yoshida, M. (2013). IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep* 33, 735-741.

Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B., and Glaser, E. (1990). Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 188, 247-252.

O'Keeffe, B.A., Cilia, S., Maiyar, A.C., Vaysberg, M., and Firestone, G.L. (2013). The serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (Sgk-1) mitochondria connection: identification of the IF-1 inhibitor of the F(1)F(0)-ATPase as a mitochondria-specific binding target and the stress-induced mitochondrial localization of endogenous Sgk-1. *Biochimie* 95, 1258-1265.

Ortega, A.D., Willers, I.M., Sala, S., and Cuezva, J.M. (2010). Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J Cell Sci* 123, 2685-2696.

Pagliarini, D.J., and Dixon, J.E. (2006). Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 31, 26-34.

Pagliarini, D.J., Wiley, S.E., Kimple, M.E., Dixon, J.R., Kelly, P., Worby, C.A., Casey, P.J., and Dixon, J.E. (2005). Involvement of a mitochondrial phosphatase in the regulation of ATP production and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 19, 197-207.

Pagnozzi, D., Birolo, L., Leo, G., Contessi, S., Lippe, G., Pucci, P., and Mavelli, I. (2010). Stoichiometry and topology of the complex of the endogenous ATP synthase inhibitor protein IF(1) with calmodulin. *Biochemistry* 49, 7542-7552.

Pan, B., Chen, Y., Song, H., Xu, Y., Wang, R., and Chen, L. (2015). Mir-24-3p downregulation contributes to VP16-DDP resistance in small-cell lung cancer by targeting ATG4A. *Oncotarget* 6, 317-331.

Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., and Simon, M.C. (2007). Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 27, 912-925.

Panchenko, M.V., and Vinogradov, A.D. (1985). Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett* 184, 226-230.

Papa, S., De Rasmio, D., Scacco, S., Signorile, A., Technikova-Dobrova, Z., Palmisano, G., Sardanelli, A.M., Papa, F., Panelli, D., Scaringi, R., and Santeramo, A. (2008). Mammalian complex I: a regulable and vulnerable pacemaker in mitochondrial respiratory function. *Biochim Biophys Acta* 1777, 719-728.

Papa, S., Rasmio, D.D., Technikova-Dobrova, Z., Panelli, D., Signorile, A., Scacco, S., Petruzzella, V., Papa, F., Palmisano, G., Gnoni, A., Micelli, L., and Sardanelli, A.M. (2012). Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett* 586, 568-577.

Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C., and Minuto, M. (1996). Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial FOF1 ATP synthase. *Eur J Biochem* 240, 461-467.

Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D.X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B.M., Skinner, M.E., Lombard, D.B., and Zhao, Y. (2013). SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell* 50, 919-930.

Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., Trinkle-Mulcahy, L., Harper, M.E., Germain, M., and Slack, R.S. (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J* 33, 2676-2691.

Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J.M., Brethes, D., and Velours, J. (2002). Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 41, 10390-10396.

Pedersen, P.L., and Hüllihen, J. (1984). Inhibitor peptide of mitochondrial proton adenosine triphosphatase. Neutralization of its inhibitory action by calmodulin. *J Biol Chem* 259, 15148-15153.

Plun-Favreau, H., Burchell, V.S., Holmstrom, K.M., Yao, Z., Deas, E., Cain, K., Fedele, V., Moiso, N., Campanella, M., Miguel Martins, L., Wood, N.W., Gourine, A.V., and Abramov, A.Y. (2012). HtrA2 deficiency causes mitochondrial uncoupling through the F(1)F(0)-ATP synthase and consequent ATP depletion. *Cell Death Dis* 3, e335.

Pullman, M.E., and Monroy, G.C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* 238, 3762-3769.

Qian, L., Van Laake, L.W., Huang, Y., Liu, S., Wendland, M.F., and Srivastava, D. (2011). miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med* 208, 549-560.

Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Yao, C., Jin, L., Ma, J., and Jin, Y. (2010). miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* 5, e9429.

Quiros, P.M., Espanol, Y., Acin-Perez, R., Rodriguez, F., Barcena, C., Watanabe, K., Calvo, E., Loureiro, M., Fernandez-Garcia, M.S., Fueyo, A., Vazquez, J., Enriquez, J.A., and Lopez-Otin, C. (2014). ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep* 8, 542-556.

Quiros, P.M., Langer, T., and Lopez-Otin, C. (2015). New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 345-359.

Rafelski, S.M. (2013). Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biol* 11, 71.

Rahman, M., Nirala, N.K., Singh, A., Zhu, L.J., Taguchi, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Shaw, L.M., Lambright, D.G., Acharya, J.K., and Acharya, U.R. (2014). *Drosophila* Sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase beta and regulates complex V activity. *J Cell Biol* 206, 289-305.

Rainbolt, T.K., Atanassova, N., Genereux, J.C., and Wiseman, R.L. (2013). Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation. *Cell Metab* 18, 908-919.

Rainbolt, T.K., Saunders, J.M., and Wiseman, R.L. (2015). YME1L degradation reduces mitochondrial proteolytic capacity during oxidative stress. *EMBO Rep* 16, 97-106.

Rardin, M.J., He, W., Nishida, Y., Newman, J.C., Carrico, C., Danielson, S.R., Guo, A., Gut, P., Sahu, A.K., Li, B., Uppala, R., Fitch, M., Riiff, T., Zhu, L., Zhou, J., Mulhern, D., Stevens, R.D., Ilkayeva, O.R., Newgard, C.B., Jacobson, M.P., Hellerstein, M., Goetzman, E.S., Gibson, B.W., and Verdin, E. (2013a). SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab* 18, 920-933.

Rardin, M.J., Newman, J.C., Held, J.M., Cusack, M.P., Sorensen, D.J., Li, B., Schilling, B., Mooney, S.D., Kahn, C.R., Verdin, E., and Gibson, B.W. (2013b). Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6601-6606.

Rasola, A., and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12, 815-833.

Ricart, J., Izquierdo, J.M., Di Liegro, C.M., and Cuezva, J.M. (2002). Assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the beta-subunit of the mitochondrial H⁺-ATP synthase requires the participation of two distal cis-acting elements and a complex set of cellular trans-acting proteins. *Biochem J* 365, 417-428.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-578.

Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Korbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., Krause, E., Patzold, S., Villanueva, J., Krepler, C., Fukunaga-Kalabis, M., Hoth, M., Bastian, B.C., Vogt, T., and Herlyn, M. (2013). Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 23, 811-825.

Rouslin, W., and Broge, C.W. (1990). Regulation of the mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in situ during ischemia and in vitro in intact and sonicated mitochondria from slow and fast heart-rate hearts. *Arch Biochem Biophys* 280, 103-111.

Rouslin, W., and Broge, C.W. (1992). Why the mitochondrial ATPase inhibitor IF1 fails to inhibit the mitochondrial ATPase in situ in fast heart-rate mammalian and avian hearts. *Ann N Y Acad Sci* 671, 505-506.

Rouslin, W., and Broge, C.W. (1996). IF1 function in situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat, and pigeon hearts. *J Biol Chem* 271, 23638-23641.

Rouslin, W., Broge, C.W., and Grupp, I.L. (1990). ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *Am J Physiol* 259, H1759-1766.

Rouslin, W., Frank, G.D., and Broge, C.W. (1995). Content and binding characteristics of the mitochondrial ATPase inhibitor, IF1, in the tissues of several slow and fast heart-rate homeothermic species and in two poikilotherms. *J Bioenerg Biomembr* 27, 117-125.

Rouslin, W., and Pullman, M.E. (1987). Protonic inhibition of the mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in ischemic cardiac muscle. Reversible binding of the ATPase inhibitor protein to the mitochondrial ATPase during ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 19, 661-668.

Roy, L., Bikorimana, E., Lapid, D., Choi, H., Nguyen, T., and Dahl, R. (2015). MiR-24 is required for hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet* 11, e1004959.

Ruzzenente, B., Metodiev, M.D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C.B., Camara, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J.B., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2012). LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J* 31, 443-456.

Sah, J.F., Kumar, C., and Mohanty, P. (1993). pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 1521-1528.

Salvi, M., Brunati, A.M., and Toninello, A. (2005). Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 38, 1267-1277.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A Laboratory manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanchez-Arago, M., and Cuezva, J.M. (2011). The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med* 9, 19.

Sanchez-Arago, M., Formentini, L., Martinez-Reyes, I., Garcia-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Willers, I.M., Aldea, M., Najera, L., Juarranz, A., Lopez, E.C., Clofent, J., Navarro, C., Espinosa, E., and Cuezva, J.M. (2013a). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis* 2, e46.

Sanchez-Arago, M., Garcia-Bermudez, J., Martinez-Reyes, I., Santacatterina, F., and Cuezva, J.M. (2013b). Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep* 14, 638-644.

Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A.D., Garcia-Huerta, P., Sanchez-Arago, M., and Cuezva, J.M. (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem* 285, 25308-25313.

Sardanelli, A.M., Signorile, A., Nuzzi, R., Rasmø, D.D., Technikova-Dobrova, Z., Drahota, Z., Occhiello, A., Pica, A., and Papa, S. (2006). Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 580, 5690-5696.

Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496, 372-376.

Sasarman, F., Brunel-Guitton, C., Antonicka, H., Wai, T., and Shoubridge, E.A. (2010). LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell* 21, 1315-1323.

Sastri, M., Haushalter, K.J., Panneerselvam, M., Chang, P., Fridolfsson, H., Finley, J.C., Ng, D., Schilling, J.M., Miyanochara, A., Day, M.E., Hakoziaki, H., Petrosyan, S., Koller, A., King, C.C., Darshi, M., Blumenthal, D.K., Ali, S.S., Roth, D.M., Patel, H.H., and Taylor, S.S. (2013). A kinase interacting protein (AKIP1) is a key regulator of cardiac stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E387-396.

Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., Neher, S.B., Oakes, E.S., Siddiqui, S.M., Wah, D.A., and Baker, T.A. (2004). Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119, 9-18.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1412-1417.

Scarpulla, R.C. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 321-334.

Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.

Schnizer, R., Van Heeke, G., Amaturio, D., and Schuster, S.M. (1996). Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 1292, 241-248.

Sebens Muerkoster, S., Rausch, A.V., Isberner, A., Minkenberg, J., Blaszczyk, E., Witt, M., Folsch, U.R., Schmitz, F., Schafer, H., and Arlt, A. (2008). The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF-kappa B inhibition. *Oncogene* 27, 1122-1134.

Shah, D.I., Takahashi-Makise, N., Cooney, J.D., Li, L., Schultz, I.J., Pierce, E.L., Narla, A., Seguin, A., Hattangadi, S.M., Medlock, A.E., Langer, N.B., Dailey, T.A., Hurst, S.N., Faccenda, D., Wiwczar, J.M., Heggors, S.K., Vogin, G., Chen, W., Chen, C., Campagna, D.R., Brugnara, C., Zhou, Y., Ebert, B.L., Danial, N.N., Fleming, M.D., Ward, D.M., Campanella, M., Dailey, H.A., Kaplan, J., and Paw, B.H. (2012). Mitochondrial Atpif1 regulates haem synthesis in developing erythroblasts. *Nature*.

Sharma, K., D'Souza, R.C., Tyanova, S., Schaab, C., Wisniewski, J.R., Cox, J., and Mann, M. (2014). Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep* 8, 1583-1594.

Shen, L., Zhi, L., Hu, W., and Wu, M.X. (2009). IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ* 16, 603-612.

Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.

Singh, R., and Saini, N. (2012). Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis--a combined computational and experimental approach. *J Cell Sci* 125, 1568-1578.

Sol, E.M., Wagner, S.A., Weinert, B.T., Kumar, A., Kim, H.S., Deng, C.X., and Choudhary, C. (2012). Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase sirt3. *PLoS One* 7, e50545.

Steinberg, S.F., and Brunton, L.L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 751-773.

Sterky, F.H., Ruzzenente, B., Gustafsson, C.M., Samuelsson, T., and Larsson, N.G. (2010). LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 759-764.

Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R.R., and Kuhlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27, 1154-1160.

Sun, Q., Zhang, Y., Yang, G., Chen, X., Cao, G., Wang, J., Sun, Y., Zhang, P., Fan, M., Shao, N., and Yang, X. (2008). Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* 36, 2690-2699.

Sun, X., Wheeler, C.T., Yolitz, J., Laslo, M., Alberico, T., Sun, Y., Song, Q., and Zou, S. (2014). A Mitochondrial ATP Synthase Subunit Interacts with TOR Signaling to Modulate Protein Homeostasis and Lifespan in *Drosophila*. *Cell Rep* 8, 1781-1792.

Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G., and Corral-Debrinski, M. (2003). The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14, 3848-3856.

Tan, A.S., Baty, J.W., Dong, L.F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., Pesdar, E.A., Sobol, M., Filimonenko, A., Stuart, S., Vondrusova, M., Kluckova, K., Sachaphibulkij, K., Rohlena, J., Hozak, P., Truksa, J., Eccles, D., Haupt, L.M., Griffiths, L.R., Neuzil, J., and Berridge, M.V. (2015). Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab* 21, 81-94.

Tatsuta, T., and Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* 27, 306-314.

Teixeira, F.K., Sanchez, C.G., Hurd, T.R., Seifert, J.R., Czech, B., Preall, J.B., Hannon, G.J., and Lehmann, R. (2015). ATP synthase promotes germ cell differentiation independent of oxidative phosphorylation. *Nat Cell Biol* 17, 689-696.

Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D.A., Mavelli, I., and Lippe, G. (2002). Dimerization of FOF1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim Biophys Acta* 1556, 133-141.

Tsai, N.P., Bi, J., and Wei, L.N. (2007). The adaptor Grb7 links netrin-1 signaling to regulation of mRNA translation. *EMBO J* 26, 1522-1531.

Tsuchiya, N., Fukuda, H., Nakashima, K., Nagao, M., Sugimura, T., and Nakagama, H. (2004). LRP130, a single-stranded DNA/RNA-binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membrane, and interacts with mRNA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 736-743.

Twig, G., Hyde, B., and Shirihai, O. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1092-1097.

Valcarce, C., Navarrete, R.M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J., and Cuezva, J.M. (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263, 7767-7775.

Valsecchi, F., Ramos-Espiritu, L.S., Buck, J., Levin, L.R., and Manfredi, G. (2013). cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)* 28, 199-209.

van der Lee, R., Lang, B., Kruse, K., Gsponer, J., Sanchez de Groot, N., Huynen, M.A., Matouschek, A., Fuxreiter, M., and Babu, M.M. (2014). Intrinsically disordered segments affect protein half-life in the cell and during evolution. *Cell Rep* 8, 1832-1844.

Vande Walle, L., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* 15, 453-460.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Vassilopoulos, A., Pennington, J.D., Andresson, T., Rees, D.M., Bosley, A.D., Fearnley, I.M., Ham, A., Flynn, C.R., Hill, S., Rose, K.L., Kim, H.S., Deng, C.X., Walker, J.E., and Gius, D. (2014). SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. *Antioxid Redox Signal* 21, 551-564.

Vazquez-Martin, A., Corominas-Faja, B., Cufi, S., Vellon, L., Oliveras-Ferraro, C., Menendez, O.J., Joven, J., Lupu, R., and Menendez, J.A. (2013). The mitochondrial H(+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle* 12, 207-218.

Viale, A., Pettazzoni, P., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Sanchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A.K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., Kang, Y., Yuan, M., Asara, J.M., Wang, Y.A., Heffernan, T.P., Kimmelman, A.C., Wang, H., Fleming, J.B., Cantley, L.C., DePinho, R.A., and Draetta, G.F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* 514, 628-632.

Vincow, E.S., Merrihew, G., Thomas, R.E., Shulman, N.J., Beyer, R.P., Maccoss, M.J., and Pallanck, L.J. (2013). The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6400-6405.

Walker, J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans* 41, 1-16.

Wang, L., and Qian, L. (2014). miR-24 regulates intrinsic apoptosis pathway in mouse cardiomyocytes. *PLoS One* 9, e85389.

Wang, Q., Huang, Z., Xue, H., Jin, C., Ju, X.L., Han, J.D., and Chen, Y.G. (2008). MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* 111, 588-595.

Wang, T., Marquardt, C., and Foker, J. (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261, 702-705.

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.

Wilkie-Grantham, R.P., Matsuzawa, S., and Reed, J.C. (2013). Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. *J Biol Chem* 288, 12777-12790.

Willers, I.M., Martínez-Reyes, I., Martínez-Diez, M., and Cuezva, J. (2012). miR-127-5p targets the 3'UTR of human β -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1817, 838-848.

Williams, C.C., Jan, C.H., and Weissman, J.S. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* 346, 748-751.

Wittig, I., and Schagger, H. (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787, 672-680.

Wong, W., and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 959-970.

Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 18-29.

Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu, J., Zhang, Y.C., Suo, W.H., Liu, X.B., Shen, W.W., Tian, H., and Fu, G.H. (2010). Induction of anion exchanger-1 translation and its opposite roles in the carcinogenesis of gastric cancer cells and differentiation of K562 cells. *Oncogene* 29, 1987-1996.

Wu, M.X. (2003). Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 8, 11-18.

Xie, Y., Tobin, L.A., Camps, J., Wangsa, D., Yang, J., Rao, M., Witasz, E., Awad, K.S., Yoo, N., Ried, T., and Kwong, K.F. (2013). MicroRNA-24 regulates XIAP to reduce the apoptosis threshold in cancer cells. *Oncogene* 32, 2442-2451.

Xu, F., Addis, J.B., Cameron, J.M., and Robinson, B.H. (2012). LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *Biochem J* 441, 275-283.

Xu, G., Shin, S.B., and Jaffrey, S.R. (2009). Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19310-19315.

Yang, W., Zheng, Y., Xia, Y., Ji, H., Chen, X., Guo, F., Lyssiotis, C.A., Aldape, K., Cantley, L.C., and Lu, Z. (2012). ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol* 14, 1295-1304.

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9-14.

Yu, W.M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 12, 62-74.

Yun, J., and Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metab* 19, 757-766.

Zanotti, F., Gnani, A., Mangiullo, R., and Papa, S. (2009). Effect of the ATPase inhibitor protein IF1 on H⁺ translocation in the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 43-48.

Zhao, X., Leon, I.R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Hojlund, K., and Jensen, O.N. (2011). Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol Cell Proteomics* 10, M110.000299.

Zheng, S.Q., Li, Y.X., Zhang, Y., Li, X., and Tang, H. (2011). MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B. *Antiviral Res* 89, 219-226.

Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A.N., Heck, A.J., and Mohammed, S. (2013). Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* 12, 260-271.

Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793, 5-19.

ANEXO. PUBLICACIONES